PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS UND WILLIAM SEIFRIZ
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK UND FRIEDL WEBER
ROSTOCK GRAZ

BAND XLIV, HEFT 3
MIT 82 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 25. OKTOBER 1954

WIEN
SPRINGER-VERLAG
1955

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut,
Graz, Schubertstraße 51, Österreich

oder an

Prof. Dr. J. Spek, Zoologisches Institut,
(3a) Rostock, Universitätsplatz, Deutschland, DDR

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mölkerbastei 5
Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10 % der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezieher der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen" und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

XLIV. Band — Inhaltsverzeichnis — 3. Heft

Abhandlungen

Seite

Grave, Gisela: Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus* 273

Bierling, R.: Zur Bedeutung der lokalen Mitochondriendichte für die Formkonstanz von Zellen 299

Linser, H.: Die Wuchsstoffwirksamkeit von β-Naphthoxyessigsäure und Indol-3-Essigsäure in gepufferten Lanolinpasten verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen 307

Lettré, H., und Annelies Schleich: Zur Bedeutung der Adenosintriphosphorsäure für Formkonstanz und Formänderungen von Zellen 314

Kopetzky-Rechtperg, O.: Beobachtungen an Protoplasma und Chloroplasten der Alge *Netrium digitus* (Ehrenberg) bei Kultur unter Lichtabschluß 322

Sponsler, O. L., and J. D. Bath: Some Features of *Nitella* Chloroplasts as Revealed by the Electron Microscope 332

Scheidl, W.: Vakuolenkontraktion bei vollen Zellsäften an Zwiebelzellen von *Tulipa silvestris* und *Colchicum speciosum* 336

Wiede, M., und F. Meyer: Über die Toxizität einiger Fluorochrome 342

Ziegler, Magda: Untersuchungen über Wundreizreaktionen an Pflanzen. 350

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus*

Von

Gisela Grave

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster i. W.

Mit 27 Textabbildungen

(Eingelangt am 22. Mai 1954)

Seit der Wiederentdeckung der Granastruktur durch Heitz (1932, 1936) und Doutreligne (1935) ist der Feinbau der erwachsenen Chloroplasten mit direkten und indirekten Methoden eingehend bearbeitet worden. Hellfeldmikroskopisch konnte erkannt werden, daß die scheibchenförmigen Grana in den Chloroplasten in zur Oberfläche parallelen Schichten nebeneinander und in Geldrollen übereinander angeordnet sind (Heitz 1936, Strugger 1951). Polarisationsoptische Untersuchungen ergaben, daß die Plastiden über die mikroskopisch sichtbare Schichtung hinaus aus abwechselnden Protein- und Lipoidlamellen aufgebaut sein müssen (Scarth 1924, Küster 1933, Menke 1934a, b, Weber 1936, Menke und Küster 1938 u. a.), und durch elektronenoptische Aufnahmen wurde diese Lamellierung zuerst in den Grana und neuerdings auch im Stroma direkt nachgewiesen (Frey-Wyssling und Mühlethaler 1949, Steinmann 1952, Fineam, Sjöstrand und Steinmann 1953, Wolken und Schwaertz 1953, Cohen und Bowler 1953). Zusammenfassende Berichte vom Stand der Strukturforschung geben Strugger (1951), Weier und Stocking (1952) und Frey-Wyssling (1953).

In seinen letzten Arbeiten hat Strugger (1950, 1953, 1954a, b) die bislang auf die erwachsenen Chloroplasten beschränkte Strukturanalyse auch auf die jungen Plastiden der meristematischen Zonen ausgedehnt. In den Meristemen der Blattbasen beobachtete er erstmalig, daß sich die Proplastiden von den Chondriosomen durch den Besitz eines scheibchenförmigen primären Granums unterscheiden. Durch die Feststellung, daß die Proplastiden verschiedener Pflanzen regelmäßig auch in den Meristemen der Vegetationskegel ein solches primäres Granum führen, ist die jahrzehntelang diskutierte Frage, ob sich die Plastiden aus Chondriosomen entwickeln oder nicht, endgültig entschieden worden (Literatur vgl. Strug-

ger 1954a). Da sich die primären Grana in den Proplastiden nach den Befunden von Strugger (1950, 1953, 1954a) und Böing (1954) durch identische Reproduktion vermehren und vor jeder Proplastidenteilung eine solche Reproduktion stattfindet, ist außer der Individualität und Kontinuität der Plastiden auch die Kontinuität der Grana in den meristematischen Zellen zur Diskussion gestellt. Es ist nun von Interesse, ob auch bei der Metamorphose, bei der Entwicklung vom monogranulären, teilungsfähigen Proplastiden zum ausgewachsenen, somatischen Chloroplasten eine Kontinuität der Grana zu beobachten ist. Strugger (1954a) stellte bereits in der Ergrünungszone von *Agapanthus* eine verstärkte Granateilung fest, und Böing (1954) wies bei *Helodea* nach, daß beim Ergrünen nach Etiolement die Sekundärgrana vom primären Granum gebildet werden. Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung dieser Frage beitragen.

Da die wenigen in der Literatur vorliegenden Angaben über Fixation und Einbettung der Plastiden sehr widerspruchsvoll sind und bei den Proplastiden unzureichende Fixations- und Färbemethoden die Ursache vieler Fehldeutungen waren, mußten eingehende methodische Untersuchungen über die Wirkung von Fixation, Einbettung und Quellung auf die Struktur der Chloroplasten in verschiedenen Altersstadien der Strukturanalyse voraus bzw. parallel gehen. Der methodische Teil nimmt deshalb in der vorliegenden Arbeit einen breiten Raum ein.

Material und Optik

Als Versuchspflanzen für die gesamte Arbeit dienten kräftige Exemplare von *Agapanthus umbellatus* L'Hérit. Die Pflanzen standen im Winter im Gewächshaus des Botanischen Gartens an ziemlich dunklem Standort, im Sommer in der Sonne oder an leicht beschatteten Plätzen. Zum Vergleich wurden, vor allem bei den methodischen Untersuchungen, folgende Pflanzen herangezogen: *Helodea, Sagittaria spec. Chlorophytum comosum, Allium cepa, Dracaena deremensis, Impatiens parviflora, Pisum sativum, Stellaria media, Galinsoga quadriradiata, Ambulia heterophylla, Vallisneria gigantea.*

Beobachtet wurde mit dem binokularen Forschungsmikroskop von E. Leitz (Immersionsobjektive $^1/_{12}$ Öl, A = 1,30 und $^1/_{16}$ Fl. Öl, A = 1,32). Als Mikroskopierlampe diente eine Niedervoltleuchte von Zeiß-Winkel mit Blau- oder Grünfilter. Fluoreszenzoptische Untersuchungen wurden vereinzelt vergleichsweise herangezogen, aber nicht systematisch durchgeführt, da die zur Verfügung stehende Ausrüstung für diese schwierigen Untersuchungen nicht ausreichte.

Die mikrophotographischen Aufnahmen wurden größtenteils mit dem Panphot (Leitz) gemacht (Objektive wie oben, Periplan-Okular 8×). Für die Lebendaufnahmen wurde die Leica (Miflex, Zeiß) benutzt. Die Vergrößerung beträgt (mit Ausnahme der Abb. 20 u. 24) ~ 1600. Die Zeichnungen sind alle im gleichen Maßstab angefertigt (1 μ = 0,5 cm).

Die Wirkung der Fixation auf die Chloroplastenstruktur

Die Analyse der Struktur der erwachsenen Chloroplasten ist lange Zeit fast ausschließlich an lebenden oder isolierten Chloroplasten geführt worden. Nur vereinzelt finden sich in der Literatur Angaben über die Fixation

der Granastruktur, z. B. bei Zirkle (1927, 1928, 1929), Heitz (1936), Weier (1936 a, b), Beauverie (1938), Dangeard (1944), De Rezende-Pinto (1948) und Strugger (1951). Die Arbeiten stimmen aber in ihren Ergebnissen nicht überein. Nur das bereits von A. Meyer (1883) empfohlene OsO_4 hat sich regelmäßig als brauchbar erwiesen (Heitz 1936, Strugger 1951 u. a.). In den letzten Jahren ist es von Strugger (1951) und für elektronenoptische Untersuchungen wiederholt benutzt worden. Bei der Erforschung der Plastidenentwicklung führte das gleichartige Verhalten von Plastiden und Chondriosomen gegenüber den „méthodes mitochondriales" sowie ihre in den jüngsten Stadien sehr ähnliche Größe und Gestalt zahlreiche Autoren zu der Ansicht, daß sich die Plastiden aus Chondriosomen entwickeln. Um diese Ansicht zu widerlegen, benutzten andere Autoren, z. B. De Rezende-Pinto (1948), essigsäurehaltige Gemische, in denen sich die Chondriosomen auflösen, während die Plastiden noch zu erkennen sind. Strugger (1950, 1953, 1954 a) wies dann nach, daß das für die Proplastiden charakteristische primäre Granum sich nach Fixation mit OsO_4 und bei einigen Pflanzen auch nach Fixation mit dem Gemisch von Lewitzky darstellen läßt, während es nach den anderen zur Chondriosomendarstellung benutzten Gemischen (Benda, Regaud) nicht zu sehen ist. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Fixationsbilder noch kritischer beurteilt und ständig mit dem lebenden Material verglichen werden müssen. Um die unterschiedlichen Resultate in der Literatur beurteilen und fixierte Präparate für die Analyse der Strukturentwicklung benutzen zu können, wurden einige Fixationsmittel, besonders die in der Literatur angegebenen, geprüft und das Fixationsbild mit dem Aussehen der lebenden Plastiden verglichen (vgl. S. 286).

Methodik

Hand-Flächenschnitte oder schmale Blattstreifen wurden mit dem Fixationsmittel infiltriert, 30 Min. bzw. 3—6 Std. (wenn nicht anders angegeben) fixiert und einige Stunden gewässert. Von den Blattstreifen wurden mit der Hand Quer- oder Längsschnitte angefertigt, die wie die Flächenschnitte ungefärbt in Leitungswasser untersucht wurden.

OsO_4 2%

Die Plastiden sind sehr kompakt fixiert und lassen die Grana nur in Flächenstellung schwach erkennen. Die Osmiumsäure wirkt so stark gelatinierend, daß eine elektive Anfärbung der Grana und die Darstellung der Geldrollenstruktur erst nach Quellung mit KOH, dann aber ausgezeichnet möglich ist (vgl. Strugger 1951). Von Nachteil ist, daß in den tiefer gelegenen Zellen die Fixation oft unterschiedlich ist und junge und gerbstoffhaltige Zellen durch das zu OsO_2 reduzierte Fixationsmittel stark geschwärzt werden.

Man versucht vielfach, diese Nachteile durch Zusatz anderer Fixationsmittel zu beheben. Die Wirkung der in den üblichen Gemischen zugesetzten Säuren und Salze auf die Plastiden wurde zuerst getrennt geprüft.

$K_2Cr_2O_7$ 3%

Die Fixation der ausgewachsenen Plastiden ist in der Regel gut. Die Grana und Geldrollen sind gut zu erkennen. Nach längerer Fixation (24 Std. und mehr) wird die grüne Farbe der Chloroplasten blasser bzw. bräunlich, und die Granastruktur wird undeutlich. Gelegentlich können die Grana etwas vergrößert (vergrößerte „Poren", Zirkle 1927) oder in ihrer Form verändert, d. h. in Flächenstellung etwas länglich sein. Auch stärkere Schädigungen (kleine Vakuolen, unregelmäßig verteilte und geformte Grana, am Chloroplastenrande herausgelöste Grana) kommen bei erwachsenen und vor allem bei jungen Plastiden vor. Für die Darstellung der Proplastidenstruktur ist die Fixation ungeeignet.

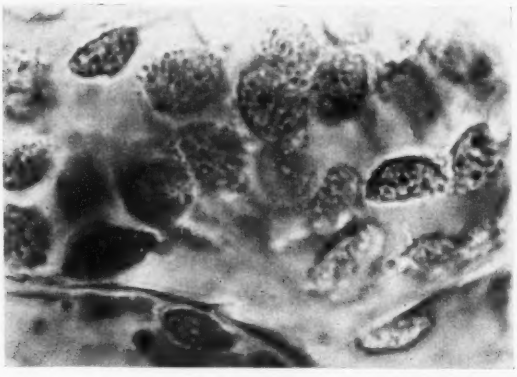


Abb. 1. Erwachsene Chloroplasten, Handschnitt von einem 3 Std. mit Essigsäure fixierten Blattstreifen, ungefärbt. In Profilstellung sieht man, daß die Grana kugelförmig geworden sind. Stellenweise ist die Geldrollenanordnung noch zu erkennen. Einige Plastiden sind am Rande etwas aufgelöst.

Essigsäure 3%

Während die Struktur in Flächenstellung bei jungen und alten Plastiden relativ gut erhalten aussieht, erkennt man in Profilstellung, daß die Grana kugelförmig geworden sind und ihre Anordnung gestört ist. Nur selten sind die Geldrollen noch zu sehen. Die Plastiden quellen und lösen sich manchmal an den Rändern etwas auf.

Die Proplastiden werden auch in der Form stark verändert und sind im schlecht fixierten Plasma kaum noch sicher zu erkennen. Eine Fixation mit Essigsäure ist daher für Strukturuntersuchungen an alten wie an jungen Plastiden ungeeignet. Vermutlich ist De Rezende-Pinto (1948, 1952) durch die Beobachtung von mit Essigsäure fixierten Präparaten zu seiner irrtümlichen Auffassung von der Chloroplastenstruktur und ihrer Entwicklung und zur Ablehnung der Existenz der von Strugger beschriebenen primären Grana in den Proplastiden gelangt.

Chromsäure 1%

Die Plastiden sind stark geschrumpft. Sie sind grau gefärbt, und die Grana sind kaum zu erkennen. In Profilstellung sieht man eine streifige Artefaktbildung, die in gleicher Weise bei der Fixation mit

Chromessigsäure

auftritt. Durch den Zusatz von Essigsäure werden die Plastiden nur etwas gequollen, so daß die Struktur besser zu erkennen ist. Das Aussehen der Chloroplasten erinnert in Flächenstellung zwar an die normale Struktur, aber bei genauer Betrachtung sieht man, daß die Grana teilweise nicht mehr rund, sondern länglich sind und sich berühren bzw. miteinander verschmelzen. In Profilstellung sind die Plastiden unregelmäßig, grob streifig. Gelegentlich ist die lamellare Anordnung dabei noch angedeutet.

Flemming (Chromsäure 1% + OsO_4 2% + Eisessig 15:4:1)

Die schädliche Wirkung der beiden Säuren ist in den einzelnen Partien des Schnittes unterschiedlich, aber sie ist deutlich zu erkennen. Die Plastiden sind am Rande häufig etwas aufgelöst und die Grana stellenweise kugelig geworden. Meist aber sind die Plastiden in Flächen- wie in Profilstellung streifig. Das Fixationsbild stellt ein Artefakt dar und zeigt keine Parallele mehr zu der in vivo beobachtbaren Struktur.

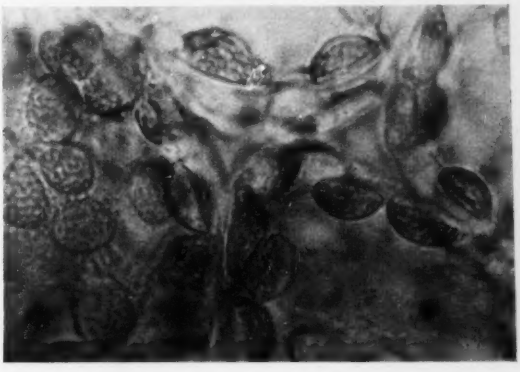


Abb. 2. Erwachsene Chloroplasten, Flächenschnitt, 15 Min. mit Chromessigsäure fixiert, ungefärbt. Durch die Formänderung der Grana ist die Struktur in Flächenstellung unregelmäßig. In Profilstellung sind die Plastiden gequollen und streifig. Die lamellare Anordnung der Grana ist gelegentlich noch zu sehen.

Chromosmiumsäure (Chromsäure 1% + OsO_4 2% 15:4)

Champy (Chromsäure 1% + $K_2Cr_2O_7$ 3% + OsO_4 2% 7:7:4)

Die Struktur ist zwar besser erhalten als nach Fixation mit Flemmingschem Gemisch, aber es zeigen sich noch gelegentlich — insbesondere in Profilstellung — die dort beschriebenen Artefakte. Die Gemische sind für Strukturanalysen nicht zu empfehlen. Das primäre Granum der Proplastiden läßt sich nach beiden Fixationen nicht darstellen (Strugger 1934 a). In diesem Zusammenhang ist auch das elektronenmikroskopische Ergebnis von Leyon (1953) an Proplastiden zu sehen. Leyon behandelte die mit OsO_4 fixierten Objekte mit Chromsäure nach. Nach unseren Erfahrungen wird dabei das primäre Granum zerstört.

Altmann ($K_2Cr_2O_7$ 3% + OsO_4 2% 1:1)

Die Fixation aller Altersstadien der Plastiden sowie die Erhaltung der

Chondriosomen und des Cytoplasmas ist gut. Die Schnitte sind weniger geschwärzt als nach Fixation mit reinem OsO_4.

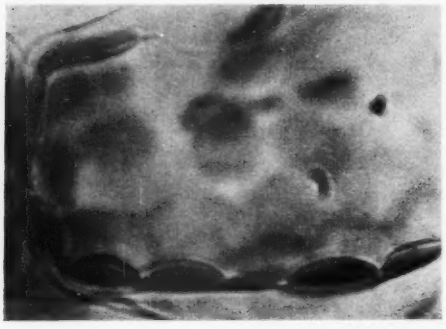


Abb. 3. Ausgewachsene Chloroplasten in Profilstellung. Handschnitt von einem 6 Std. mit Formaldehyd fixierten Blattstreifen, ungefärbt. Die Geldrollenstruktur ist einwandfrei erhalten und bei den Plastiden des unteren Randes gut zu erkennen. Der Protoplast hat sich von der Zellwand abgehoben (obere Zellwand).

Formaldehyd 1—4%

Bei Fixation (3—6 Std.) mit 1—4%igem, nicht neutralisiertem Formol bleibt die Struktur der erwachsenen Chloroplasten einwandfrei erhalten. Erst nach längerer Fixation (24—48 Std.) wird die frischgrüne Farbe etwas blasser.

Das Cytoplasma und die anderen Zellelemente sind nicht gut erhalten. Der Protoplast hebt sich häufig von der Zellwand ab, und das Cytoplasma zwischen den Plastiden ist vakuolisiert.

Die Fixation der Jungchloroplasten und polygranulären Proplastiden[1] ist nicht immer gut. Manchmal kugeln sich die Plastiden ab, oder sie zeigen Vakuolen, sind unregelmäßig grün ohne deutlich erkennbare Stuktur. Im Gegensatz zu den ausgewachsenen Plastiden ist es hier vorteilhaft, das Formol mit $CaCO_3$ zu neutralisieren.

Form und Struktur der monogranulären Proplastiden werden durch Formaldehyd nicht erhalten.

Auch hier wurde versucht, die Nachteile der Fixation, nämlich die geringe Resistenz gegen nachfolgende Alkoholbehandlung und die unzureichende Fixation der übrigen Zellelemente, durch Zusatz anderer Fixationsmittel zu beheben.

Abb. 4. Ausgewachsene Chloroplasten in Flächenstellung, fixiert wie Abb. 3. Die Chloroplasten und Grana sind in Form und Größe unverändert und gut erhalten. Das Plasma zwischen den Plastiden ist vakuolisiert.

[1] Jungchloroplasten sind polygranulär und haben eine feste, runde oder linsenförmige Gestalt, die durch den lamellären Aufbau bedingt ist. Proplastiden sind monogranulär und amöboid oder — beim Übergang zum Jungchloroplasten — polygranulär und nicht mehr so auffallend amöboid wie die monogranulären Proplastiden, aber noch von unregelmäßiger Form.

Lewitzky (Chromsäure 1% + HCHO 10% 1:9)

Durch den Chromsäurezusatz werden polygranuläre Chloroplasten in Profilstellung streifig (vgl. die Fixation mit Chromsäure). Bei monogranulären Proplastiden von *Chlorophytum* und anderen Pflanzen (nicht von *Agapanthus*) ergibt das Gemisch dagegen ausgezeichnete Resultate (Strugger 1953).

Regaud ($K_2Cr_2O_7$ 3% + HCHO 35% 4:1)

Die Struktur der erwachsenen Chloroplasten bleibt verhältnismäßig gut erhalten. Gelegentlich, vor allem wieder bei den jüngeren Plastiden, sind Fixationsartefakte wie bei reiner Dichromatfixation zu beobachten. Die Struktur der monogranulären Proplastiden wird nicht konserviert (Strugger 1954 a).

Zusatz von Sublimat oder Pikrinsäure zu Formaldehyd (4%iges Formol, mit Sublimat oder Pikrinsäure gesättigt)

Die Plastiden sind geschrumpft und ziemlich kompakt. In Flächenstellung sind die Grana gerade noch zu erkennen. In Profilstellung ist die Struktur unregelmäßig.

Zusatz von $CaCl_2$ (HCHO 8% + $CaCl_2$ 2% 1:1)

Ein Zusatz von $CaCl_2$ wird zur Stabilisierung der Lipoide (Baker 1946) bzw. zur Unterbindung einer quellenden Wirkung des Formols (Gross und Lohaus 1932) empfohlen. Bei ausgewachsenen Plastiden wird die Quellfähigkeit mit KOH herabgesetzt. Bei polygranulären Proplastiden ist die Fixation der Granastruktur wie bei reinem Formol nicht zuverlässig, aber doch häufig zufriedenstellend. Die amöboide Gestalt der Proplastiden bleibt bei $CaCl_2$-Zusatz besser erhalten.

Zusatz von $La(NO_3)_3$ (HCHO 8% + $La(NO_3)_3$ 1% 1:1)

Da Lanthannitrat die Nucleinsäuren fällt und die Plastiden und besonders die Grana Nucleinsäuren enthalten sollen (Chiba 1951, Metzner 1952), war die Wirkung von $La(NO_3)_3$ auf die Fixation von Interesse. Die Struktur der erwachsenen Chloroplasten ist gut erhalten. Nach 6—8stündiger Fixation beginnen aus einzelnen Grana grün gefärbte, feine Schläuche herauszuwachsen, deren Aussehen an Myelinfiguren erinnert. Ein Teil des Chlorophylls und vermutlich auch der Lipoide wird aus den Grana herausgelöst, die aber trotzdem sichtbar bleiben. Eine erhöhte Resistenz gegenüber Alkohol ist nicht zu beobachten.

Aethyl-Alkohol

Alkohol mit oder ohne Zusatz von Sublimat oder Pikrinsäure wurde von Zimmermann (1893), Kränzlin (1908), Heitz (1936), Weier

(1936a), Metzner (1932) u. a. benutzt. Die Wirkung niedriger Alkoholkonzentrationen (bis 30%) auf Chloroplasten ist von Liebaldt (1913) untersucht worden.

Bei Fixation mit

70—100%igem Alkohol

werden das Chlorophyll und wahrscheinlich die Lipoide herausgelöst. Je höher die Konzentration ist, desto stärker schrumpfen die Plastiden und desto schneller verläuft die Lösung der Pigmente. Eine Entscheidung, ob die Grana erhalten geblieben sind oder nicht, ist auch bei gefärbten Präparaten oft nicht leicht zu fällen, da man, wenn die Grana herausgelöst sind, durch die dunklen Beugungsscheibchen der Hohlräume getäuscht wird. Mit Toluidinblau werden die Grana schwach, aber weitgehend elektiv gefärbt, während bei einer Färbung mit Hämatoxylin nach Heidenhain (verdünnt beizen und färben) Stroma und Grana tingiert werden und weiße Löcher zu sehen sind, wenn die Grana herausgelöst sind. Mit Hilfe dieser beiden Färbungen erkennt man, daß gerade dann, wenn die Struktur einschließlich Geldrollen relativ gut erhalten aussieht (in der Mitte des Blattes), alle Grana gelöst sind, während in den der Epidermis anliegenden Zellen die Grana teilweise erhalten sind und unregelmäßig im Stroma verteilt liegen.

Zusatz von Sublimat oder Pikrinsäure zu 60- oder 96%igem Alkohol ändert das Bild nicht wesentlich.

Die Ergebnisse aller Fixationsstudien zeigten bei *Agapanthus* in Abhängigkeit von den Außenbedingungen eine merkliche Variationsbreite und bei den anderen Versuchspflanzen graduelle Unterschiede, besonders bei den Fixationsmitteln, bei denen die Schädigungen nur geringfügig waren (Regaud, $K_2Cr_2O_7$, Champy, Chromosmiumsäure). Die unterschiedlichen Angaben in der Literatur erklären sich zum Teil durch diese Variationsbreite. Bei den positiven Befunden mit den Gemischen von Navashin, Carnoy und ähnlichen Fixationsmitteln handelt es sich aber wahrscheinlich um Fehldeutungen, denn in der Regel sind nur die Flächenstellungen der Plastiden beobachtet und die Profilstellungen, an denen die Schädigungen stärker in Erscheinung treten, nicht beachtet worden.

Die Ergebnisse sind, wie gesagt, nicht bei allen Arten gleich, aber folgende Gesetzmäßigkeiten ließen sich bei *Agapanthus* und den anderen untersuchten Arten regelmäßig feststellen, so daß sie als Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen dienen können.

Eine regelmäßig gute, für Strukturanalysen bei erwachsenen Chloroplasten brauchbare Fixation war nur mit OsO_4, dem Gemisch nach Altmann und 1—4%igem Formaldehyd möglich. Durch diese Mittel werden die beiden am Aufbau der Chloroplasten beteiligten Komponenten — Lipoide und Eiweißkörper — gut konserviert. Ungeeignet für die Fixation sind dagegen eiweißfällende Mittel (Sublimat, Pikrinsäure), die auch in Verbindung mit Formol die Feinstruktur nicht erhalten; ferner Säuren, da sie die Form der Grana ändern, so daß diese kugelförmig (durch Essig-

säurefixation) oder länglich werden (durch Chromsäurefixation). Unbrauchbar ist auch Alkohol, der durch Lösung der Pigmente und wahrscheinlich auch der Lipoide die Struktur zerstört.

Die Jungchloroplasten und polygranulären Proplastiden sind empfindlicher als die ausgewachsenen Chloroplasten. Sie werden nur von OsO_4 und OsO_4 2% + $K_2Cr_2O_7$ 3% 1:1 (Altmann) gut fixiert. In der Regel ergibt neutralisiertes, 4%iges Formol mit einem Zusatz von $CaCl_2$ bei polygranulären Proplastiden noch ausreichende Resultate, während es bei monogranulären Proplastiden unbrauchbar ist.

Monogranuläre Proplastiden zeigen — wie auch bei der Einbettung — ein etwas abweichendes Verhalten. Sie werden durch OsO_4 und bei einigen Pflanzen auch durch das Gemisch von Lewitzky ausgezeichnet fixiert (Strugger 1933, 1934a).

Die Wirkung von Entwässerung und Einbettung auf die Chloroplastenstruktur

Auch die in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse bezüglich der Einbettung von Chloroplasten sind nicht übereinstimmend (vgl. Weier 1936b, Beauverie 1938, Dangeard 1944, De Rezende-Pinto 1948). Strugger (1951) beobachtete, daß die Grana der erwachsenen Chloroplasten bei der Einbettung herausgelöst werden, während die primären Grana der Proplastiden erhalten bleiben (1934a). Für die Fragestellung dieser Arbeit ist von Interesse, in welchen Entwicklungsstadien sich die Resistenz der Grana ändert und welche Phase der Paraffineinbettung die Grana angreift. Der Einfluß der bei der Einbettung benutzten Medien auf die Struktur der verschiedenen Altersstadien wurde deshalb stufenweise geprüft.

Methodik

Blattstreifen wurden mit OsO_4, Altmann oder Formol verschieden lange fixiert, gewässert und durch ansteigende Konzentrationen von Alkohol, Aceton, Glycerin oder Pyridin in Paraffin gebracht. Aus jeder Konzentrationsstufe, in der die Streifen 2—24 Std. verblieben, wurden einige Streifen in Wasser zurückgeführt, geschnitten und untersucht.

Entwässerung

Bereits nach 1—2stündiger Fixation mit OsO_4 oder Altmann bleiben die Grana durch alle Konzentrationsstufen von Alkohol oder Aceton erhalten. In den höheren Stufen machen sich bei längerem Aufenthalt geringe Schrumpfungen bemerkbar. Mit Aceton kann die Entwässerung besonders schnell erfolgen (je 1 Std. in 70- und 100%igem Aceton genügt). Nach kurzer Formolfixation (6 Std.) schrumpfen die Plastiden in Alkohol und Aceton stark, und die Grana werden wie nach Alkoholfixation gelöst. Erst nach 48stündiger Fixation bleiben die Form der Plastiden und ein Teil der Grana erhalten.

Bei der Entwässerung in Glycerin (Hill 1916) verlieren die Plastiden etwas die Farbe, aber ihre Struktur bleibt gut erhalten.

Durch Pyridin (Bänder 1932) werden bei sehr resistenten Chloroplasten die Grana wie nach KOH-Behandlung deutlich, aber in der Regel sind die Grana bald herausgelöst.

Einbettung

Als Intermedien wurden Xylol, Benzol, Methylbenzoat und Zedernholzöl benutzt. Alle Intermedien greifen die Grana vor allem in der Wärme an. Da fixierte Grana bei der Thermostatentemperatur von ~ 60° noch nicht schmelzen, muß es sich um einen Lösungsvorgang handeln, der bei den Grana erwachsener Chloroplasten meist, nicht immer, zu einem weitgehenden Verlust der Grana führt. Die Ergebnisse sind aber nicht ein-

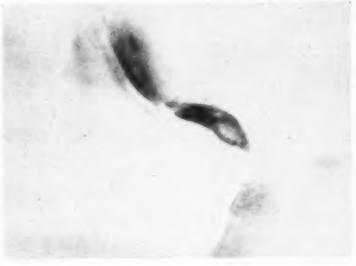


Abb. 5. Erwachsener Chloroplast mit Stärkeeinlagerung. Neben dem großen Stärkekorn sind Geldrollen, darunter ist eine Granaschicht zu sehen. 6 Std. mit Altmann fixiert, eingebettet über Aceton, Benzol in Paraffin, gefärbt mit Sudanschwarz.

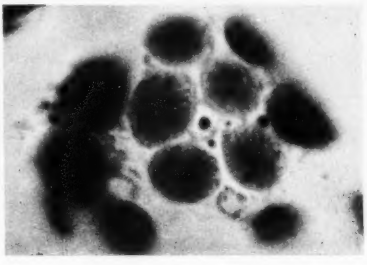


Abb. 6. Erwachsene Chloroplasten (Wintermaterial). Die Grana sind herausgelöst. Man sieht weiße Hohlräume im rot gefärbten Stroma. Eingebettet wie Abb. 5. Gefärbt mit Säurefuchsin nach Altmann.

heitlich und hängen mehr von den Lebensbedingungen der Pflanzen als von der Dauer der Fixation ab. Plastiden mit kleinen Grana und Stärke (Sommermaterial) sind resistenter als Chloroplasten mit großen Grana (Wintermaterial).

Das Verhalten bei der Einbettung ändert sich beim Übergang vom Proplastiden zum Jungchloroplasten. Mono- und polygranuläre Proplastiden und vereinzelte Jungchloroplasten lassen sich in Paraffin einbetten, während bei den älteren Stadien wie bei den erwachsenen Chloroplasten die Grana vielfach herausgelöst werden.

Färbung

Für die Färbung der Mikrotomschnitte wurde Säurefuchsin nach Altmann, Toluidinblau, Nilblausulfat, Sudanschwarz und Haematoxylin nach Heidenhain benutzt.

Säurefuchsin ergibt bei den monogranulären Proplastiden die prägnanteste Färbung (Strugger 1934a). Sobald die Plastiden polygranulär

werden, färbt sich in zunehmendem Maße auch das Stroma an, und eine Differenzierung wird immer schwieriger. Bei erwachsenen Plastiden läßt sich eine elektive Granafärbung mit Säurefuchsin nicht mehr erzielen, und auch mit den anderen Farbstoffen ist die Färbung dann schwierig und unbefriedigend. Nach Formolfixation färben Toluidinblau und Nilblausulfat am besten.

Die Dauer der Färbung betrug:

Toluidinblau und Nilblausulfat 1 : 100: 2—6 Std.

Sudanschwarz (angesetzt nach Romeis 1948): 16—24 Std.

Haematoxylin (Beize 1% und Färbung 1 : 3): 24—36 Std.

Fixierte Handschnitte junger Blattstreifen ließen sich mit Neutralrot, Fuchsin oder Rhodamin B 1 : 1000 oder mit Nilblausulfat 1 : 3000 färben. Die Färbungsdauer betrug 5—15 Minuten.

Andere Einbettungsverfahren

Bei der Einbettung in Gelatine (Methode von Heringa und Ten Berge, vgl. Romeis 1948) bleibt die Struktur erhalten. Es ist aber nach OsO_4-Fixation nicht möglich, bei den erwachsenen Plastiden die Grana elektiv zu färben und die Geldrollenstruktur sichtbar zu machen. Auch eine Quellung mit KOH zeigte nur geringen Erfolg.

Bei der Einbettung in Cremolan werden sowohl bei der Einbettungstemperatur von $\sim 50^0$ wie bei Zimmertemperatur die Grana langsam gelöst. Nach OsO_4-Fixation lassen sich die Grana bei kurzfristiger Durchtränkung erhalten. Nach Formolfixation werden sie vollständig gelöst. (Über die Verwendung von wasserlöslichen Wachsen — Cremolan, Synthawachs — berichten u. a. Blank 1949, McLane 1951, Wade 1952, Tietz 1952.)

Die Versuche zeigen, daß die Benutzung von Mikrotompräparaten nur für die jungen Entwicklungsstadien zu empfehlen ist, die sich nach der üblichen Methode in Paraffin einbetten und auch verhältnismäßig leicht färben lassen. Bei den ausgewachsenen und heranwachsenden Stadien ergibt die Paraffineinbettung unsichere, meist negative Resultate. Nach Gelatine- und Cremolaneinbettung sind die Grana zwar erhalten, aber eine Anfärbung bereitet große Schwierigkeiten, und in Profilstellung sind Geldrollen meist nicht mehr zu erkennen. Bei diesen Stadien sind alle Einbettungsverfahren der im nächsten Kapitel beschriebenen Methode unterlegen, bei der durch KOH-Behandlung eine elektive Färbbarkeit der Grana und eine gute Darstellung der Geldrollenstruktur ermöglicht wird.

Die Kalilauge-Behandlung fixierter Chloroplasten

Die eben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Färbung fixierter Chloroplasten lassen sich bei nicht eingebetteten Schnitten durch eine kurze Vorbehandlung mit KOH beseitigen (Strugger 1951). Die Kalilauge wirkt dabei in zweifacher Weise. 1. Es tritt durch die OH-Ionen der Kali-

lauge (in gleicher Weise bei NaOH und NH_4OH) eine geringfügige Verseifung der Lipoide ein, die die Grana anfärbbar macht. 2. Bei längerem Einwirken quillt der Chloroplast mehr oder weniger auf, so daß die Strukturen in Profilstellung besser erkennbar werden.

Bei den Quellungsversuchen sollte zunächst die Abhängigkeit der Quellung von der Fixations- und Wässerungsdauer festgestellt werden. Ferner interessierte das Verhalten der Jungchloroplasten im Vergleich zu den ausgewachsenen Plastiden und die Wirkung der KOH-Behandlung nach den verschiedenen Einbettungsverfahren.

Methodik

Hand-Flächenschnitte oder Blattstreifen, von denen vor der Quellung Quer- oder Längsschnitte angefertigt werden konnten, wurden mit 2%iger Osmiumsäure oder 4%igem Formaldehyd verschieden lange fixiert, gewässert und die Schnitte nach Behandlung mit 0,5%iger Kalilauge 15 Minuten in Aqua dest. gewässert und mit Nilblausulfat 1 : 5000, Thionin oder Neutralrot 1 : 1000 (in Leitungswasser) einige Minuten gefärbt. Bei jungen Chloroplasten war nach Formolfixation die Färbung mit Fuchsin 1 : 1000 (in Leitungswasser) besonders günstig. Nach Osmiumfixation halten sich die Präparate in Leitungswasser, dem etwas Formol zugesetzt wird, jahrelang. Nach HCHO-Fixation ist die Haltbarkeit auf wenige Wochen beschränkt.

Der Einfluß der Fixationsdauer und Wässerung

Nach kurzfristiger Fixation (~ 3 Std.) mit OsO_4 oder Formol quellen die ausgewachsenen Plastiden bei KOH-Behandlung rasch bis zur völligen Auflösung, aber die Struktur bleibt dabei meist nicht gut erhalten. Nach 5—6stündiger Fixation werden die Plastiden in Profilstellung ca. 2—3mal so breit wie vorher. In besonders günstigen Fällen läßt sich dann eine so weitgehende Aufblätterung erzielen, daß alle Grana einzeln liegen und ihre Anordnung in Schichten und Geldrollen durch den ganzen Chloroplasten verfolgt werden kann. In Flächenstellung vergrößern sich die Plastiden nicht so stark.

Abb. 7. Erwachsene Chloroplasten, 6 Std. mit OsO_4 fixiert, gequollen mit 0,5%iger KOH, gefärbt mit Nilblausulfat. Die Anordnung der Grana in Schichten und Geldrollen ist bei der Quellung erhalten geblieben. In der Mitte der Chloroplasten liegen 6—8 Grana übereinander.

Durch längere Fixation werden die Plastiden in zunehmendem Maße gehärtet, so daß sie dann weniger schnell und weitgehend quellen, bis sie schließlich nach ~ 24stündiger Fixation ihre Quellfähigkeit verloren haben und nur noch homogen werden und sich langsam auflösen. Wie bei der Fixation und Einbettung sind auch bei der Quellung mit KOH

die Ergebnisse unterschiedlich. Vor allem variiert die erforderliche Quellungszeit so stark, daß man am besten für jedes Blatt die günstigste Zeit durch Quellung unter mikroskopischer Beobachtung ermittelt. Auch bei kurzfristiger Fixation kommt es vor, daß die Struktur nicht deutlich erkennbar wird, sondern die Chloroplasten sich zwar verbreitern, aber dabei homogen werden.

Durch die Wässerung in Leitungswasser zwischen Fixation und KOH-Behandlung wird die Quellfähigkeit ebenfalls herabgesetzt. Nach 15—20-stündiger Wässerung ist keine gute Aufblätterung mehr zu erzielen. Am besten ist eine Wässerung von 5—10 Stunden, aber auch hier ist die Variationsbreite groß.

Die Ergebnisse stimmen im wesentlichen nach OsO_4- und Formolfixation überein. Nach Formolfixation ist die Aufblätterung in der Regel nicht so weitgehend, aber die Geldrollen und die parallel zur Chloroplastenfläche gelagerten Granaschichten sind gut zu erkennen.

Die KOH-Behandlung junger Plastiden

Die Struktur der jüngeren Plastiden ist weniger gefestigt als die der ausgewachsenen. Meist wird durch kurze Quellung (2—3 Min.) die Ordnung der Grana bereits zerstört, d. h. die Grana liegen entweder völlig unregelmäßig, oder es bilden sich falsche „Geldrollen" (vgl. S. 287). Vereinzelt erhält man aber auch hier gute Resultate, die erkennen lassen, daß im Jungchloroplasten die Struktur prinzipiell bereits wie im erwachsenen Plastiden ausgebildet ist (vgl. Abb. 16 und 17). Bei den noch jüngeren Stadien, beim Übergang vom Jungchloroplasten zum monogranulären Proplastiden, ist dagegen eine KOH- oder Na_2CO_3-Behandlung auch mit geringeren Konzentrationen (0,25%) erfolglos. Die Plastiden werden homogen, oder sie lösen sich sofort auf, vakuolisieren und verklumpen. Ihre Struktur wird nicht erkennbar.

Die KOH-Behandlung von Mikrotomschnitten

Die Grana werden, soweit sie überhaupt erhalten geblieben sind, durch die Kalilauge noch angegriffen, aber die Chloroplasten verbreitern sich kaum, sondern werden näpfchenförmig. Die Grana lassen sich nach einer KOH-Behandlung von wenigen Sekunden bis höchstens einer Minute besser färben, aber für Strukturuntersuchungen sind die Präparate nicht zu empfehlen.

Mit Hilfe der Kalilauge-Quellung läßt sich an fixierten Handschnitten die Feinstruktur der ausgewachsenen und bei genügender Kritik auch der jüngeren Chloroplasten von *Agapanthus* ausgezeichnet analysieren. Am günstigsten ist eine Fixation von 5—6 Stunden mit anschließender Wässerung von wenigen Stunden. Die Quellungszeiten sind so unterschiedlich, daß man am zweckmäßigsten die Wirkung der Kalilauge unter dem Mikroskop verfolgt. In der Regel ist eine Quellung von 3—8 Minuten mit 0,5%iger KOH erfolgreich. Bei Mikrotomschnitten kann zur Verbesserung der Granafärbung eine kurze KOH-Behandlung von einigen Sekunden bis einer Minute herangezogen werden.

Allgemeine Beobachtungen bei der Vitalanalyse

Wie schon erwähnt, ist es unerläßlich, von der Beobachtung lebender, unversehrter Chloroplasten auszugehen, um eine Täuschung durch Fixationsartefakte zu vermeiden. Auch die Lebendanalyse begegnet aber — insbesondere bei den jungen Plastiden — erheblichen Schwierigkeiten, denn die normalen Kriterien für volle Vitalität sind hier nur bedingt anwendbar. Es ist lange bekannt, daß die Granastruktur bei leichter Veränderung oder Schädigung der Zelle, wie sie sich beim Schnitt kaum vermeiden läßt, sofort deutlicher hervortritt. Die Grana sind aus diesem Grunde so lange für eine Artefaktbildung gehalten worden.

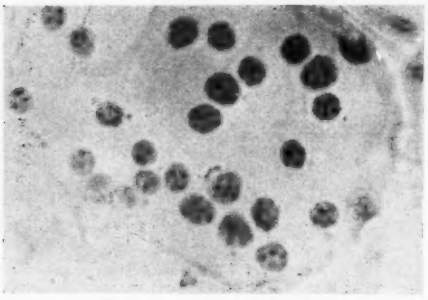


Abb. 8. Jungchloroplasten aus der hellgrünen Streckungszone eines jungen Blattes, lebend in Leitungswasser beobachtet, 20 Min. nach der Präparation des Schnittes aufgenommen. Die Grana sind relativ groß; sie sind deutlich zu erkennen.

Bei erwachsenen Chloroplasten von *Agapanthus* beginnen rund 10 bis 15 Minuten nach vorsichtiger Präparation des Schnittes die Grana langsam deutlicher zu werden. Es ist bei diesen Untersuchungen gleichgültig,

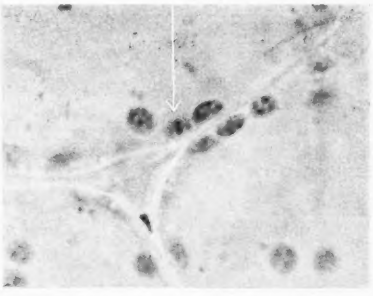


Abb. 9 und 10. Jungchloroplasten des gleichen Schnittes wie Abb. 8, nach 1 bis 2 Std. photographiert. In Profilstellung sind die Plastiden bereits etwas breiter geworden. Die Grana sind manchmal schon unregelmäßig verteilt. An einzelnen Plastiden ist die Geldrollenanordnung aber noch gut erhalten. Kern, Cytoplasma und Chondriosomen lassen noch keine Schädigung erkennen.

ob in iso-, hypo- oder hypertonischer Lösung oder in Leitungswasser untersucht wird. Man beobachtet stets einen ganz langsamen, stetigen Übergang, bei dem die Struktur allmählich immer klarer wird, während die Plasma-

strömung sowie das Aussehen von Kern und Chondriosomen zunächst noch nicht auf eine Schädigung der Zelle schließen lassen. Wenn später die Zelle abstirbt, ist die Anordnung der Grana in der Regel noch nicht gestört. Bei diesem Absterbevorgang erleiden die Plastiden selbstverständlich Veränderungen. Da aber die mikroskopische Struktur bei den erwachsenen Plastiden meistens gleich bleibt, kann man die Frage vernachlässigen, wie lange sie als vital anzusprechen und die Veränderungen reversibel sind.

Die Struktur der jungen Plastiden in der hellgrünen Streckungszone junger Blätter ist wesentlich weniger gefestigt als die der ausgewachsenen. Häufig kommt es vor, daß die Jungchloroplasten unmittelbar nach der Präparation des Schnittes fast homogen aussehen. Die Grana werden aber schnell deutlicher und beginnen gelegentlich — besonders wenn sie groß sind — zu kippen, so daß sie bei Plastiden in Flächenstellung schmal, in Profilstellung rund aussehen. Wenn diese Veränderungen an den Plastiden einsetzen, ist häufig weder am Kern noch an den Chondriosomen noch an der Plasmaströmung oder am Plasmolyseverlauf eine Schädigung der Zelle zu erkennen. Erst nach einiger Zeit, manchmal erst nach einigen Stunden, treten auch an den anderen Zellelementen Veränderungen auf. Wenn ein großer Teil der Grana gekippt ist, kann man, wie schon Heitz und Maly (1933) bemerken, auch bei Plastiden in Flächenstellung schöne „Geldrollen" erhalten, die sehr leicht mit der normalen Geldrollenstruktur verwechselt werden können. (Auch bei der Quellung fixierter Chloroplasten ist oft schwer zu entscheiden, ob es sich um eine Flächenstellung mit gekippten Grana oder um eine Profilstellung handelt, vgl. S. 285.) In Profilstellung quellen die Plastiden etwas, so daß man im Leben eine Aufblätterung beobachten kann wie sonst an fixierten und gequollenen Präparaten. In günstigen Fällen läßt sich die Geldrollenanordnung dann auch bei diesen jungen Stadien einwandfrei beobachten (vgl. Abb. 8—11).

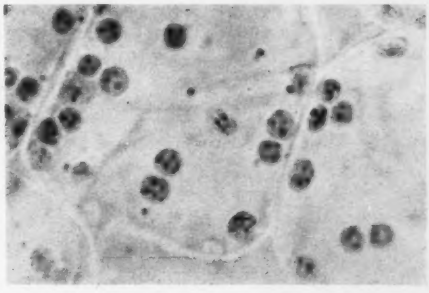


Abb. 11. Jungchloroplasten des gleichen Schnittes wie Abb. 8—10, nach 4 Std. photographiert. Die Grana sind sehr deutlich und teilweise gekippt. Die Struktur ist unregelmäßig. Kern und Plasmaströmung lassen erkennen, daß die Zelle geschädigt ist.

Beim Übergang zum Proplastidenstadium ist wie bei den monogranulären Proplastiden im Hellfeldmikroskop die Struktur in der Regel nicht zu erkennen. Zellen und Plastiden sind hier gleichermaßen empfindlich. Geschädigte Plastiden quellen, runden sich ab, Vakuolen treten auf, und die Granastruktur wird zerstört. Die Lebendanalyse mit dem Hellfeldmikroskop führt hier nicht zum Erfolg. Es bleibt abzuwarten, welche Resultate die fluoreszenzoptischen Untersuchungen dieser Stadien ergeben,

nachdem die elektive Fluoreszenz der primären Grana von Strugger (1954 b) im Gegensatz zu Heitz und Maly (1953) mit einer neuen Fluoreszenzausrüstung in den meristematischen Proplastiden nachgewiesen werden konnte.

Die an Mikrotompräparaten von polygranulären Proplastiden gewonnenen Ergebnisse werden durch gelegentliche Vitalbeobachtungen an etiolierten Plastiden sowie durch die Resultate von Böing (1954) gesichert.

Die Entwicklung der Granastruktur bei Agapanthus

Die Struktur der Proplastiden in den meristematischen Blattanlagen von *Agapanthus* ist von Strugger (1954 a) beschrieben worden. Das primäre Granum konnte bei meinen Untersuchungen nach guter Fixation und Färbung ebenfalls regelmäßig beobachtet werden.

Die weitere Entwicklung zum polygranulären Proplastiden und Jungchloroplasten zeigt eine erhebliche Variationsbreite, die von den Umweltbedingungen, z. B. Temperatur, Ernährung usw., vor allem aber von der Belichtung abhängt. Heitz (1936) beobachtete bereits, daß die ausgewachsenen Chloroplasten von Schattenpflanzen größere Grana haben als die Chloroplasten von in der Sonne gewachsenen Pflanzen. Bei *Agapanthus* schwankt die Größe der Grana erwachsener Plastiden von 0,3 μ im Sommer an sonnigem Standort bis 0,8 μ im Winter im Treibhaus. Durch die Arbeiten von Strugger (1937) und Böing (1954) ist ferner bekannt, daß die primären Grana der Proplastiden bei Etiolement stark heranwachsen, und Kaja (1954) stellte bei etiolierten Moosen ebenfalls fest, daß im Dunkeln die Zahl der Grana ab- und ihre Größe zunimmt. Durch Lichtmangel wird also die Teilung der Grana und nach Böing (1954) auch die Verteilung der bei Belichtung nach Etiolement gebildeten Sekundärgrana gehemmt.

Bei *Agapanthus* sind die jungen Blätter von den alten mehr oder weniger lange und fest umschlossen, so daß sie bei verschieden stark reduzierter Lichtintensität heranwachsen. Besonders bei den großen, kräftigen Pflanzen sind die Streckungszonen der jungen Blätter weitgehend, wenn auch nicht völlig, vom Licht abgeschlossen. Die Entwicklung setzt bei diesen Blättern langsam ein, aber sie ist in ihrem Ablauf gehemmt und läuft häufig über ähnliche Stadien, wie sie Böing bei der Entwicklung nach Etiolement beobachtete. Die jungen Blätter benötigen für die Entwicklung geringere Lichtintensitäten als die Plastiden an der Basis ausgewachsener Blätter. Ferner ist in der Umgebung der Stomata und Leitbündel die Chlorophyllbildung und Plastidenentwicklung weiter fortgeschritten als in den dazwischen liegenden Zellen. Chlorophyllbildung und Entwicklung der Granastruktur laufen nicht völlig parallel. In der Regel wird bei *Agapanthus* die polygranuläre Struktur in der ganz schwach ergrünten Zone ausgebildet. Nur wenn die Entwicklung stark gehemmt ist, ergrünt das primäre Granum stärker, bevor die Teilungen einsetzen. In diesen Fällen ist eine Lebendbeobachtung der Teilung wesentlich erleichtert. Überhaupt sind bei etiolierten Plastiden die Grana besser zu erkennen als bei normal ergrünenden Plastiden. Vorteilhaft für die Beobachtung ist auch das meist stärkefreie Herbst- und Wintermaterial mit seinen relativ großen Grana.

Im Herbst und Winter gelingt es, bei schwach etiolierten, jungen Blättern in der blaßgrünen Streckungszone in den zuerst homogen grünlich gefärbten Plastiden kurze Zeit nach der Präparation des Schnittes mehrere Grana zu erkennen, die nicht in der gleichen Ebene, sondern teils höher, teils tiefer, oft mit ungleichen Abständen im Chloroplasten verteilt liegen. Kurz bevor Zellschädigungen auftreten (vgl. S. 287), sieht man in Profilstellung Plastiden mit etwas verschobenen Geldrollen.

Ob die Plastidenstruktur hier schon Veränderungen erlitten hat oder nicht, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden. Es liegt aber die Deutung nahe, daß, wie bei den jüngeren Proplastiden, die durch Teilung entstehenden, parallel liegenden Scheibchen auseinanderweichen und durch erneute Teilung neue Geldrollen entstehen.

Abb. 12. Schwach ergrünte Plastiden mit großen Grana aus der blaßgrünen Streckungszone junger Blätter (Oktober, November). Profilstellung. Die Plastiden wurden ca. ½—1 Std. nach der Präparation des Schnittes gezeichnet. Die Zelle ließ noch keine Schädigungen erkennen.

Bei diesem Material findet man auch Plastiden mit Grana unterschiedlicher, teilweise auffallender Größe. Da die Granagröße in den ausgewachsenen Chloroplasten

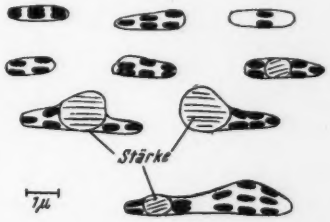


Abb. 13 und 14. Polygranuläre Proplastiden in Flächen- und Profilstellung aus der schwach ergrünten Streckungszone junger Blätter. Sommermaterial. In Flächenstellung sind die Grana noch nicht über die gesamte Fläche der Plastiden verteilt. In Profilstellung erkennt man zwei, höchstens drei Schichten. Nach fixierten Handschnitten oder Mikrotompräparaten gezeichnet.

wieder einheitlich ist, findet hier wahrscheinlich noch später eine Aufteilung der großen Grana statt. Verzweigte Geldrollen, die gelegentlich beobachtet wurden, deuten auf eine solche Aufteilung hin.

Im Sommer sind die Grana wesentlich kleiner. Die Entwicklung läßt sich am besten bei jungen Blättern von 6—8 cm Länge verfolgen, die an der Basis farblos sind und in 2—3 cm Abstand von der Basis eine leichte Gelbgrünfärbung zeigen, die sich stetig bis zur intensiv grünen, dem vollen Licht ausgesetzten Spitze hin verstärkt.

Diese Plastiden ergrünen scheinbar homogen und lassen im Leben erst beim Übergang zum Jungchloroplasten Grana erkennen, eine Beobachtung,

die Heitz und Maly (1933) zu der Annahme führte, daß die Grana aus dem Stroma neu entstehen. An fixierten und gefärbten Handschnitten oder an Mikrotomschnitten erkennt man aber am Beginn der Ergrünungszone, daß in den noch etwas amöboiden Plastiden 4—6 Grana dicht beisammenliegen oder mehrere Grana über einen Teil des Chloroplasten verteilt sind. Die Fixation und besonders die elektive Färbung der Grana sind in diesem Stadium sehr schwierig. An guten Präparaten konnten aber Proplastiden, wie sie die Abb. 13 und 14 zeigen, sicher beobachtet werden.

Die Grana haben keinen festen Zusammenhalt, sondern verteilen sich ziemlich schnell über die gesamte Fläche der Chloroplasten. In Profilstellung erkennt man an ungequollenen Präparaten zwei bis drei Schichten. Wenn die Grana die Fläche der Chloroplasten erfüllen, haben die Chloroplasten ihre Amöboidie weitgehend verloren und eine feste, runde oder linsenförmige Gestalt. Wir bezeichnen sie dann als Jungchloroplasten.

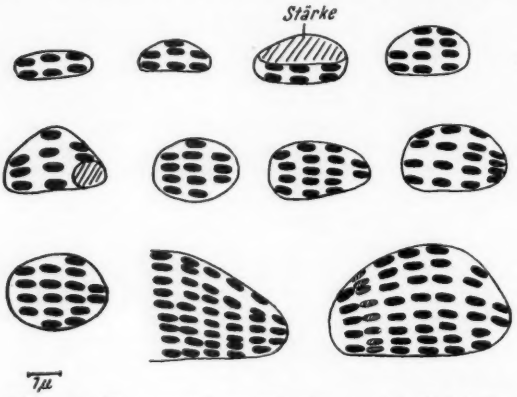


Abb. 13. Heranwachsende Plastiden in Profilstellung. Protokollzeichnungen von Präparaten, die mit OsO_4 oder HCHO fixiert und mit KOH gequollen wurden. Der vorletzte Chloroplast zeigt, wie die Schichten am Rande zusammenlaufen. Beim letzten sind die tiefer liegenden Grana durch schwächere Farbe angedeutet. Vom Jungchloroplasten an sind die Grana regelmäßig in Geldrollen angeordnet.

Die weitere Entwicklung dieser Jungchloroplasten läßt sich gut an gequollenen Präparaten verfolgen. Bei Sommer- wie bei Wintermaterial vergrößern sich die Chloroplasten in der Fläche zunächst nur wenig. In Profilstellung dagegen vermehrt sich die Zahl der Schichten rasch und ziemlich gleichmäßig über den gesamten Chloroplasten hin. Selbst bei einer Größe von 3—4 μ und sechs bis acht Schichten sind die Plastiden aber noch ziemlich labil. Erst wenn das Wachstum im wesentlichen abgeschlossen ist und die Chloroplasten tief grün sind, verfestigt sich die Struktur endgültig.

Die Chloroplasten quellen in der Mitte stärker als am Rande. An den Seiten sind selten die einzelnen Grana zu erkennen. In günstigen Fällen ist bei extrem stark gequollenen Chloroplasten beim Senken des Tubus in Profilstellung zu sehen, daß die tieferen Grana der gleichen Schicht angehören wie die höheren.

Wie schon erwähnt, findet man bei der Entwicklung der Chloroplasten von *Agapanthus* verschiedene, durch Lichtmangel bedingte Hemmungs-

erscheinungen, die mit der von Böing (1934) bei *Helodea* beobachteten Entwicklung nach Etiolement weitgehend übereinstimmen.

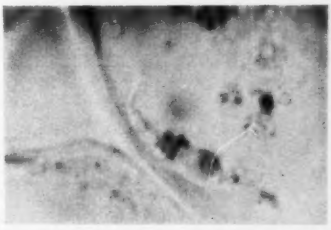


Abb. 16 und 17. Jungchloroplasten aus der hellgrünen Streckungszone, mit Formol fixiert, mit 0,5%igem KOH gequollen und mit Nilblausulfat gefärbt. Die geordnete Lage der Grana ist gut erhalten geblieben. Auch die Trägerlamellen sind zu erkennen.

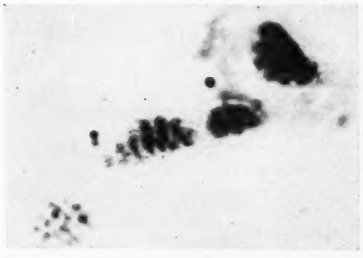


Abb. 18 und 19. Ausgewachsene Chloroplasten, mit OsO_4 fixiert, mit 0,5%iger KOH gequollen und mit Nilblausulfat gefärbt. Man erkennt die Abnahme der Granazahl an den Seiten und das Zusammenlaufen der Schichten.

An der Basis älterer Blätter, die sich nicht mehr wesentlich verlängern, findet man große Proplastiden mit primären Grana von 1—2 μ Durchmesser, die sich beim Ergrünen in fünf oder mehr Sekundärgrana aufteilen, wobei die ursprüngliche Größe und die scharfe Begrenzung des primären Granums — schwach gefärbt gegenüber den stark gefärbten Sekundärgrana — noch sicher zu erkennen ist. Die Grana verteilen sich nicht, sondern bleiben ziemlich dicht beisammen. Außerhalb des Granakomplexes ist das Stroma farblos und fluoreszenzfrei. Dieser Komplex wird größer und dehnt sich allmählich über das ganze Plastid aus.

Die gleichen Stadien ließen sich an der weißen oder schwach ergrünten Basis ausgewachsener Blätter von *Sagittaria* oder *Dracaena* beobachten.

Abb. 20. In Sekundärgrana aufgeteiltes Primärgranum aus der Basis eines erwachsenen Blattes von *Sagittaria spec.* Mikrotompräparat, nach Altmann gefärbt. Vergr. 1 : 1400.

Diese Plastiden entwickeln sich meist nicht mehr zu normalen Chloroplasten, sondern bleiben auf einer frühen Entwicklungsstufe stehen.

Die zerfallenden großen Grana von *Lithops* (Heitz 1936) zeigen das gleiche Aussehen.

In jungen Blättern, die durch die älteren vom Licht abgeschlossen werden, beobachtet man vor allem im Winter andere Hemmungserscheinungen.

Abb. 21. Proplastiden aus der Basis ausgewachsener Blätter von *Agapanthus*, nach dem Leben gezeichnet. Die primären Grana ergrünen elektiv und teilen sich dann in vier bis sechs Sekundärgrana, die zunächst in einem scharf begrenzten Komplex beisammen bleiben und erst allmählich auseinanderweichen.

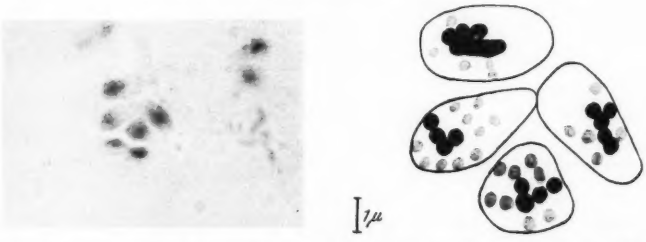


Abb. 22 und 23. Ergrünende, in ihrer Entwicklung durch Lichtmangel gehemmte Plastiden aus der gelbgrünen Streckungszone junger Blätter. Mehrere dicht gedrängt liegende und stark gefärbte Grana sind von schwächer gefärbten Grana umgeben. Mikrotompräparat, nach Altmann fixiert und gefärbt. Rechts die Zeichnung.

In der hier meist gelben Streckungszone kommt es vor, daß sich mehrere, dicht gedrängt liegende und stärker gefärbte Grana von den schwächer gefärbten unterscheiden, die in alle Richtungen abwandern (Abb. 22 u. 23).

Auch wenn die Grana bereits das ganze Plastid erfüllen, hebt sich noch ein manchmal mehr rundlicher, manchmal in Einzelgrana auflösbarer Komplex ab. Erst bei der weiteren Entwicklung gleicht sich die Differenz aus (Abb. 24 u. 25).

Die gleichen Bilder wie Abb. 24 und 25 erhält man auch als Endstadium einer Entwicklung, bei der zuerst ein intensiv grün (bzw. im nach Altmann

Abb. 24 und 25. Ergrünte Jungchloroplasten aus der hellgrünen Zone etiolierter, junger Blätter. Die Entwicklungshemmung ist noch an den eng beisammen liegenden Grana zu erkennen. Mikrotompräparat, nach Altmann fixiert und gefärbt. Vergr. 1 : 1400. Rechts die Zeichnung.

gefärbten Mikrotompräparat rot) gefärbtes großes Granum, das eventuell schon in Teilgrana zerfallen sein kann, inmitten eines homogen grünlichen oder schwach granulierten Stromas liegt. Die Plastiden sind ihrer Form, Größe und Farbe nach als Jungchloroplasten anzusprechen. In Mikrotompräparaten kann man bei der Färbung so stark differenzieren, daß das primäre Granum elektiv gefärbt ist und das Plastid sich von einem Proplastiden nur durch die Größe und Form unterscheidet. (Vermutlich haben Heitz und Maly (1953) diese Stadien bei ihren Untersuchungen vorgelegen. Vgl. ihre Abbildungen.) In etwas älteren Blattpartien erscheinen auch im vorher homogenen Stroma die Grana, und der Unterschied gleicht sich aus.

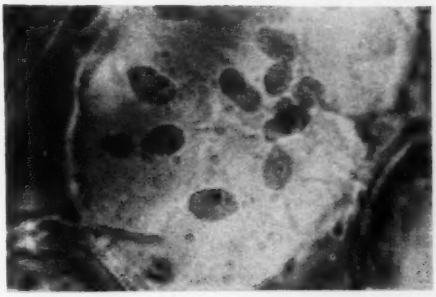


Abb. 26. Jungchloroplasten mit noch erhalten gebliebenen intensiv grün gefärbten primären Grana. Lebend. Daneben kleine Sekundärgrana.

Diskussion der Ergebnisse

Die Existenz der primären Grana, über die Strugger (1950) erstmalig berichtete, ist von De Rezende-Pinto (1948, 1952) und Heitz und Maly (1953) bestritten worden, weil sie im Leben in den jungen Plastiden weder im Hellfeld- noch im Fluoreszenzmikroskop eine Struktur erkennen konnten. Strugger (1954a) konnte aber zeigen, daß die primären Grana

optisch maskierte Strukturen sind, die im Leben im Hellfeldmikroskop erst durch Quellung oder Entquellung des Stromas oder durch Einlagerung von Farbstoffen (Rhodamin B, Chlorophyll) sichtbar werden. Im Fluoreszenzmikroskop sind sie nach neuesten Untersuchungen (Strugger 1934b) bereits in den jungen Meristemen durch ihre elektive Rotfluoreszenz nachweisbar, und im Mikrotompräparat lassen sie sich (nach guter Fixation und Färbung!) bei den verschiedensten Pflanzen regelmäßig und gut darstellen, so daß ihr Nachweis gesichert ist.

Wie bei den monogranulären Proplastiden ist auch bei den ersten Entwicklungsstadien — trotz des Chlorophyllgehaltes — im Leben häufig keine Struktur zu erkennen. Das braucht aber auch hier nicht zu bedeuten, daß die Grana vorübergehend nicht vorhanden sind. Zwischen den Brechungsindizes von Stroma und Grana muß ein nicht kontinuierlicher Unterschied bestehen, wenn die Grana sichtbar sein sollen, und das ist nicht immer — auch bei erwachsenen Plastiden in wechselndem Maße — der Fall. Wie bei den Wurzelleukoplasten (Bartels 1934) ist in den scheinbar homogen ergrünenden Plastiden im Mikrotompräparat die Granastruktur nachweisbar. Ob auch im Fluoreszenzmikroskop die Grana zu erkennen sind, muß durch neue Untersuchungen mit der modernsten Ausrüstung entschieden werden.

Besonders bei etiolierten Plastiden konnte sowohl die Aufteilung des primären Granums als auch die räumliche Beziehung der Sekundärgrana zum Primärgranum im Leben wie im Mikrotompräparat in Übereinstimmung mit den Befunden von Böing (1934) beobachtet werden. Nach diesen Ergebnissen ist die Annahme, daß immer zumindest eine substantielle Beziehung der Sekundärgrana zum primären Granum besteht, wahrscheinlicher als die Hypothese einer Neuentstehung der Grana aus dem Stroma. Ob das Stroma immer farblos ist oder ob es zwischendurch Chlorophyll enthalten kann, wird sich schwer entscheiden lassen. Es sei daran erinnert, daß auch beim erwachsenen Chloroplasten im Hellfeldmikroskop die Farblosigkeit des Stromas nicht immer sicher zu erkennen ist. Wenn die Chloroplasten sich abgerundet haben, beobachtet man regelmäßig zwei bis drei Granaschichten, die sich dann rasch vermehren, bis im erwachsenen Chloroplasten acht bis zwölf Schichten übereinander liegen. Ob sich die Sekundärgrana wie die Primärgrana durch Teilung parallel zur Fläche vermehren, läßt sich nicht direkt beobachten, da die Strukturen unter der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegen und erst durch Quellung sichtbar werden. Es spricht aber dafür, daß die Grana vom jungen Plastiden an immer in Geldrollen angeordnet sind und auch bei anomalen Plastiden, z. B. bei einer apochlorotischen Mutante von *Vicia Faba*, die Grana in kurzen Geldrollen liegen (Abb. 27).

Für junge wie für ausgewachsene Chloroplasten wird die Frage der im Struggerschen Modell geforderten Trägerlamellen diskutiert. Polarisationsoptisch ist schwer zu entscheiden, ob der ganze Chloroplast oder nur die Grana doppelbrechend, d. h. lamelliert sind. Nach Menke (1934) und neuerdings Böing (1934) ist die Doppelbrechung auf die Grana be-

schränkt, und elektronenoptisch war zuerst auch nur die Schichtung der Grana nachgewiesen worden. Durch die Arbeiten von Fineam, Sjöstrand und Steinmann (1953), Cohen und Bowler (1953) und Wolken und Schwaertz (1953) ist die durchgehende Lamellierung jetzt aber elektronenoptisch belegt worden. Offen bleibt noch, wann und wie die Lamellen entstehen. Heitz und Maly (1953) diskutieren die Denkschwierigkeiten, die sich ergeben, wenn ein festes Lamellensystem bereits in den jungen Plastiden angenommen wird. Nach der vorliegenden Arbeit ist zu dieser Frage folgendes festzustellen.

Bei Lebendbeobachtung etiolierter Plastiden wie bei Mikrotompräparaten zeigt sich, daß bei Beginn der Ausbildung der polygranulären Struktur sich das Stroma zwischen den Grana ändert. Es wird zunehmend schwieriger, die Grana elektiv zu färben. Das Stroma verfestigt sich, die Plastiden verlieren ihre Amöboidie und werden zu ellipsenförmigen bis runden Jungchloroplasten. Die Grana sind dann in zwei bis drei Schichten angeordnet. Vermutlich beginnt bei dieser Umwandlung die Ausbildung der Trägerlamellen. Alle Beobachtungen lassen aber erkennen, daß der Zusammenhalt zwischen den Grana noch nicht sehr fest ist, sondern daß er leicht, z. B. durch die Präparation des Schnittes oder, im normalen Zellgeschehen, bei der Teilung gelöst werden kann. Vom Jungchloroplasten an festigt sich dann die Lamellierung. Eine Vermehrung der Geldrollen findet vermutlich nur am Rande der Plastiden statt (vgl. Heitz und Maly 1953 und Böing 1954), an dem die Lamellen zusammenlaufen. Beim ausgewachsenen Chloroplasten hat sich die Lamellierung so gefestigt, daß die Ordnung der Grana häufig selbst bei extremer Quellung erhalten bleibt.

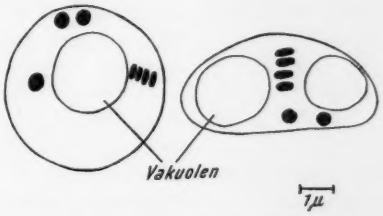


Abb. 27. Plastiden einer apochlorotischen Mutante von *Vicia Faba*. Im vakuolisierten Stroma liegen unregelmäßig verteilt einige Grana. Gelegentlich sind kurze Geldrollen zu erkennen.

Über Änderungen in der chemischen Zusammensetzung im Verlauf der Entwicklung kann nach den Ergebnissen der Fixations-, Einbettungs- und Quellungsversuche nur wenig gesagt werden. Der Unterschied zwischen Proplastiden und Jungchloroplasten im Verhalten bei der Einbettung bzw. gegenüber KOH spricht dafür, daß sich der Gehalt, die Zusammensetzung oder die Bindungsart der Lipoide in den Grana vielleicht im Zusammenhang mit der Chlorophylleinlagerung ändern. Auch bei den ausgewachsenen Plastiden zeigt die große Variationsbreite im Verhalten gegenüber Fixation, Einbettung und Quellung, daß sich trotz gleichbleibender mikroskopischer Struktur im Verlauf der Stoffwechselprozesse die Zusammensetzung der Plastidensubstanz, vor allem die der Lipoide, ändert (vgl. Bot 1942). Licht, Temperatur und Wassergehalt dürften hierbei wirksam sein, aber um genauere Aussagen machen zu können, müßten die Zusammenhänge systematisch geprüft werden.

Zusammenfassung

1. Die Angaben von Strugger (1950, 1954a), daß sich in den Proplastiden nach guter Fixation und Färbung regelmäßig ein scheibchenförmiges primäres Granum nachweisen läßt, konnten bestätigt werden.

2. Dieses primäre Granum ergrünt bei Belichtung nach Etiolement elektiv und wird damit auch im Leben sichtbar. Auch in diesem Punkt stimmen die Ergebnisse der Arbeit mit denen von Strugger (1954a) und Böing (1954) überein.

3. Es zeigte sich, daß die Entwicklung der polygranulären Struktur weitgehend von der Belichtung abhängig ist und bei *Agapanthus* durch Lichtmangel häufig die gleichen Hemmungen auftreten, die Böing (1954) bei etiolierten Plastiden von *Helodea* beobachtete.

4. In vielen Fällen ist entweder eine Aufteilung des primären Granums oder eine mehr oder weniger enge räumliche Beziehung der Sekundärgrana zum Primärgranum zu beobachten. Die Ergebnisse machen die Kontinuität der Grana bei der somatischen Differenzierung sehr wahrscheinlich.

5. Im Proplastiden werden zunächst zwei Granaschichten ausgebildet, die sich rasch vermehren. Im ausgewachsenen Chloroplasten liegen in der Mitte 8—10 Grana übereinander, an den Seiten weniger.

6. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die Grana bereits in den jungen Chloroplasten durch Lamellen verbunden sind, die sich im Verlauf der Entwicklung zunehmend verfestigen.

7. Die Vitalanalyse wird erschwert durch die Tatsache, daß sich Schädigungen der Zelle an den Plastiden früher auswirken als an den anderen Zellbestandteilen.

8. Der Strukturanalyse mußten methodische Untersuchungen vorausgehen. Die Fixation der Granastruktur aller Altersstadien ist außer mit der von Strugger empfohlenen Osmiumsäure mit einem Gemisch von OsO_4 2% + $K_2Cr_2O_7$ 3% 1:1 (Altmann) möglich. 4%iger Formaldehyd fixiert ausgewachsene Chloroplasten gut und Jungchloroplasten und polygranuläre Proplastiden mit einem Zusatz von $CaCl_2$ ausreichend.

9. Nur eiweißfällende und saure Fixationsgemische sind für die Erhaltung der Granastruktur ungeeignet.

10. Bei den ersten Entwicklungsstadien ist wie bei den monogranulären Proplastiden (Strugger 1953) eine Entwässerung und Einbettung in Paraffin möglich. Die Grana der heranwachsenden und ausgewachsenen Chloroplasten werden durch die Intermedien meist herausgelöst.

11. Die Chloroplasten können in Gelatine und nach OsO_4-Fixation auch in Cremolan eingebettet werden. Eine elektive Anfärbung der Grana und Darstellung der Geldrollenstruktur ist allerdings sehr schwierig.

12. Die von Strugger (1951) eingeführte KOH-Quellung fixierter Plastiden hat bei fixierten Handschnitten wesentlich bessere Erfolge als nach Einbettung.

13. Die Plastiden sind in Abhängigkeit von den Außenbedingungen (Licht, Temperatur, Jahreszeit usw.) unterschiedlich empfindlich gegenüber Entwässerung, Einbettung und Quellung.

Die Arbeit wurde als Dissertation am Botanischen Institut der Universität Münster i. Westf. ausgeführt. Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. S. Strugger, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

Literatur

Baker, J. R., 1946: The histochemical recognition of lipin. Quart. J. microsc. Sci. *87*, 441.

Bänder, A., 1952: Bericht über eine Schnelleinbettungsmethode für Paraffinschnitte. Z. Mikr. *60*, 502.

Bartels, F., 1954: Studien an Leucoplasten der *Vicia-Faba*-Wurzeln. Dissertation Münster, noch nicht veröffentlicht.

Beauverie, 1938: La structure granulaire des grains du chlorophylle. Rev. cytol. et cytophys. 3, 80.

Blank, H., 1952: A rapid imbedding method for preparing histological sections employing a water soluble wax. J. Invest. Dermatol. *12*, 93.

Böing, J., 1954: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Chloroplasten. Dissertation Münster, im Druck.

Bot, G. M., 1942: The chemical composition of chloroplast granules (grana) in relation to their structure. Chronica Botanica *7*, 66.

Chiba, Y., 1951: Cytochemical studies on chloroplasts. I. Cytologic demonstration of nucleic acids in chloroplasts. Cytologia *16*, 259.

Cohen and Bowler, 1953: Lamellar structure of the *Tobacco* chloroplast. Protoplasma *42*, 414.

Dangeard, P., 1944: Observations sur la structure des chloroplastes. C. r. Acad. Sc. Paris *219*, 626.

Doutreligne, S. J., 1935: Note sur la structure des chloroplastes. Proc. Acad. v. Wetensch. Amsterdam 38, 886.

Fineam, Sjöstrand und Steinmann, 1953: Exper. Cell. Res. *4*, No. 4.

Frey-Wyssling, A., 1953: Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. New York and Amsterdam.

— und Mühlethaler, 1949: Über den Feinbau der Chlorophyllkörner. Vjsch. Naturf. *94*, Heft 3, 179.

Gross und Lohaus, 1932: Untersuchungen über die Wirkung von Härtungsflüssigkeiten auf tierische Gewebe. Z. wiss. Mikr. *49*, 168.

Heitz, E., 1932: Die Herkunft der Chromocentren. Planta *18*, 616.

— 1936: Untersuchungen über den Bau der Plastiden. Planta *26*, 134.

— und R. Maly, 1953: Zur Frage der Herkunft der Grana. 1953: Z. Naturf. *8 b*, 243.

Hill, 1916: A method for the dehydration of histological material. Bot. Gaz. *61*, 253.

Kaja, H., 1954: Untersuchungen über die Entwicklung und Struktur der Moosplastiden. Ber. D. Bot. Ges. LXVII, 93.

Kränzlin, G., 1908: Anatomische und farbstoffanalytische Untersuchungen an panaschierten Pflanzen. Dissertation Berlin.

Küster, E., 1933: Anisotrope Plastiden. Ber. dtsch. Bot. Ges. *51*, 523.

Leyon, H., 1953: The structure of chloroplasts. Exp. Cell Res. *4*, 371.

Liebaldt, E., 1913: Über die Wirkung wäßriger Lösungen oberflächenaktiver Substanzen auf die Chlorophyllkörner. Z. Bot. *5*, 65.

McLane, S. R., 1951: Higher polyethylene glycols as a water soluble matrix for sectioning fresh or fixed plant tissues. Stain. technol. *26*, 63.
Menke, W., 1934a: Chloroplastenstudien. Protoplasma *21*, 279.
— 1934b: Chloroplastenstudien. Protoplasma *22*, 56.
— und Küster, 1938: Dichroismus und Doppelbrechung vergoldeter Chloroplasten. Protoplasma *30*, 283.
Metzner, H., 1952: Cytochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Nucleinsäuren in Chloroplasten. Biol. Zbl. *71*, 257.
Meyer, A., 1883: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Arthur Felix, Leipzig.
de Rezende-Pinto, 1948: O problema da origem dos plastidos. Brotéria, Série de Ciencias naturais, Vol. XVII, Fasc. 1.
— 1952: Über die Genese und die Struktur der Chloroplasten bei den höheren Pflanzen. Protoplasma *41*, 336.
Romeis, B., 1948: Mikroskopische Technik. München.
Scarth, 1924: Colloidal changes associated with protoplasmic contractions. Quart. J. exper. Physiol. *14*.
Steinmann, E., 1952: Contribution to the structure of granular chloroplasts. Experientia *8*, 300.
— 1952: An electron microscopic study of the lamellar structure of chloroplasts. Exper. Cell. Res. *3*, 367.
Strugger, S., 1937: Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Plastiden mit Rhodaminen. Flora *131*, 324.
— 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. Naturw. *37*, 166.
— 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. Ber. dtsch. Bot. Ges. *64*, 69.
— 1953: Über die Struktur der Proplastiden. Ber. dtsch. Bot. Ges. *66*, 439.
— 1954a: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Hérit. Protoplasma *43*, 120.
— 1954b: Im Druck.
Tietz, H., 1952: Eine Schnelleinbettungsmethode für histologische Präparate mit „Synthawachsgemischen". Zt. wiss. Mikr. und mikr. Technik *61*, Heft 3.
Wade, H. W., 1952: Notes on the carbowax methods of making tissue sections. Stain. technol. *27*, 71.
Weber, F., 1956: Doppelbrechung und Grana der Chloroplasten. Molisch-Festschrift *3*, 447.
Weier, E., 1936a: The structure of the non-starch containing beet chloroplast. Amer. J. Bot. *23*, 645.
— 1936b: The structure of the chloroplast of *Pellionia pulchra*. Cytol. *7*, 304.
— and C. R. Stocking, 1952: The chloroplast: Structure, inheritance and enzymology. Bot. Rev. *18*, 14.
Wolken and Schwaertz, 1953: Chlorophyll monolayers in chloroplasts. J. gen. Physiol. *37*, 111.
Zimmermann, A., 1893: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle *1*, H. 1—3, Tübingen.
Zirkle, C., 1927: The growth and development of plastids in *Lunularia vulgaris*, *Elodea canadensis* and *Zea Mays*. Amer. J. Bot. *14*, 429.
— 1928: The effect of hydrogen-ion concentrations upon the fixation image of various salts of chromium. Protoplasma *4*, 201.
— 1929: Development of normal and divergent plastid types in *Zea Mays*. Bot. Gaz. *88*, 186.

Zur Bedeutung der lokalen Mitochondriendichte für die Formkonstanz von Zellen

Von

Robert Bierling

Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg

Mit 13 Textabbildungen

(Eingelangt am 25. Juni 1954)

Nachdem eine Reihe von biochemischen Untersuchungen [1] die Lokalisation wichtiger zellulärer Fermentsysteme, wie diejenigen der biologischen Oxydation und des Citronensäurecyclus, in den Mitochondrien aufklären konnte, erhebt sich die Frage, wie sich ihre daraus abzuleitenden Funktionen in ihrem morphodynamischen Verhalten äußern. Beobachtungen an fixiertem Material und an Gewebekulturen [2, 3] haben ergeben, daß die Verhaltensweise dieser Zellorganelle offenbar gewisse Regelmäßigkeiten im Zusammenhang mit funktionellen Leistungen aufweist und daher einen empfindlichen Indikator für besondere Funktionszustände der Zelle darstellt. Für die Analyse solcher Vorgänge ist die phasenoptische Untersuchung des Verhaltens lebender Zellen und ihrer Organellen über längere Zeitabschnitte eine besonders brauchbare Methode.

Unter der Annahme, daß sich die fermentativen Oxydationsprozesse an den inneren bzw. äußeren Oberflächen der Mitochondrien abspielen, wird man folgern dürfen, daß bei voller Aktivität dieser Zellpartikel in ihrer näheren Umgebung das Niveau an Adenosintriphosphorsäure (ATP) besonders hoch ist, daß es aber bei ihrer Inaktivierung bzw. Abwesenheit in gewissen Zellregionen absinkt. Die Höhe des ATP-Spiegels aber läßt sich indirekt an der Form oder dem Verhalten der Zelloberfläche ablesen, wenn man von der Vorstellung ausgeht, daß diese ein mechanochemisches System darstellt, dessen Tonus weitgehend von der Höhe des ATP-Spiegels abhängt. Lettré [4] hat für die Oberfläche normaler Zellen während der Mitose und der Interphase zeigen können, daß sie sich bei hohem ATP-Niveau in einem weitgehend tonischen (kontrahierten) Zustand befindet, während bei seinem Absinken regional auftretende Erschlaffung des kontraktilen Oberflächensystems erfolgt. Die Tatsache, daß durch Atmungsgifte bzw. mitochondrienaffine Farbstoffe solche Phänomene herbeigeführt,

durch zusätzliche ATP-Gabe aber auch wieder aufgehoben werden konnten, ist ein Zeichen dafür, daß offenbar die Mitochondrienaktivität (Mitochondrienfunktion), der ATP-Spiegel und das Verhalten der Zelloberfläche in einem Zusammenhang miteinander stehen. Hoffmann-Berling und Weber [5] haben an extrahierten Zellen die Fähigkeit von Zellelementen zur Kontraktion mit ATP analog den Muskelmodellen direkt demonstrieren können.

Auf Grund dieser experimentellen Ergebnisse läßt sich arbeitshypothetisch der Ansatz machen, daß ganz allgemein Veränderungen der Zellform bzw. die Zellbewegungen, welche durch regional unterschiedliche Kontraktionen und Erschlaffungen des Oberflächensystems zustande kommen, vom ATP-Niveau und dieses wiederum von dem jeweiligen Funktionszustand und dem dynamischen Verhalten der Mitochondrien abhängig sind. Die folgenden Beobachtungen des Verhaltens von Fadenmitochondrien bei gewissen Oberflächenzuständen der Zelle während der Interphase haben diese Relationen zum Gegenstand. Mit den früher verwendeten chemischen Faktoren [4] läßt sich eine experimentelle Änderung der lokalen Mitochondriendichte nur schwierig beobachten. Auf Anregung von Prof. Lettré habe ich die Wirkung von Abkühlung und Wiedererwärmung von Gewebekulturen untersucht, und hierin ließ sich eine Methode der reversiblen Mitochondrieninaktivierung finden.

Material und Methode

Die Untersuchungen wurden an Deckglaskulturen mesenchymaler Fibroblasten von neuntägigen Hühnerembryonen durchgeführt. Ihre Züchtung erfolgte in einem Nährmedium aus gleichen Teilen Hühnerplasma und Embryonalextrakt bei 38°. Die Auswahl der Kulturen geschah besonders sorgfältig daraufhin, möglichst gesunde Normalzellen zur Verfügung zu haben.

Um die fraglichen Phänomene, die sich in gleicher Weise an unbehandelten Kulturen beobachten lassen, synchron an vielen Zellen untersuchen zu können, kühlten wir 24 Stunden alte Kulturen 4—5 Stunden im Eisschrank auf $+1^{\circ}$ ab. Danach wurden sie bei Zimmertemperatur mehrere Stunden lang allmählich wieder aufgewärmt und gelangten nach dieser Zeit zur Beobachtung in den Brutschrank bei 38°. Führt man die Kulturen direkt aus dem abgekühlten Zustand in eine Umgebung von 38° über, so sind die im folgenden beschriebenen Phänomene der Oberflächenbewegung zu ausgeprägt und die Relation zu den Mitochondrien schwieriger zu beobachten.

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit der Phasenoptik der Firma Leitz, Wetzlar, durchgeführt.

Untersuchungsergebnisse

Abb. 1—3 geben zur Demonstration der Mitochondrienverteilung normale Fibroblasten oder Teile derselben bei 38° wieder.

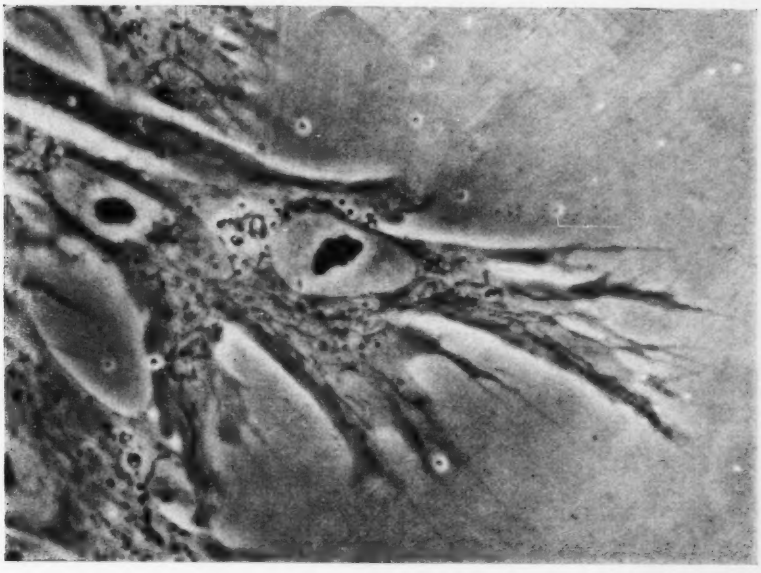


Abb. 1. Fibroblastenzelle bei normaler Temperatur mit diffuser Mitochondrienanordnung (nachvergrößert auf 1200×).

Die Aufnahmen wurden mit der Phasenoptik der Firma Leitz, Wetzlar, gemacht; Objektive Pv 70 : 1 und Pv 90 : 1, Okular: Periplan 8.

Abb. 2. Zellausläufer mit Fadenmitochondrien (nachvergrößert auf 1800×).

Die Zellen der äußeren Wachstumszone von Kulturen, die der obigen Behandlung unterworfen wurden, befinden sich unmittelbar nach der

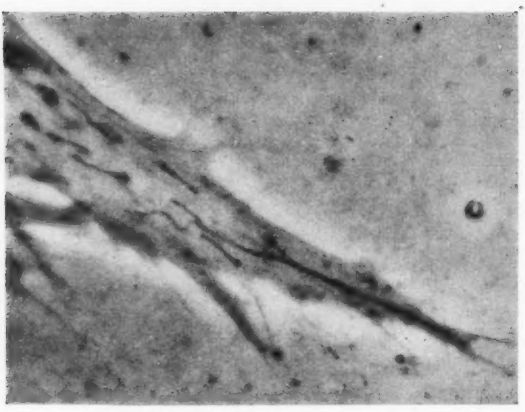


Abb. 3. Aggregat von Fadenmitochondrien im Ausläufer einer Zelle bei 38° (nachvergrößert auf 1800×).

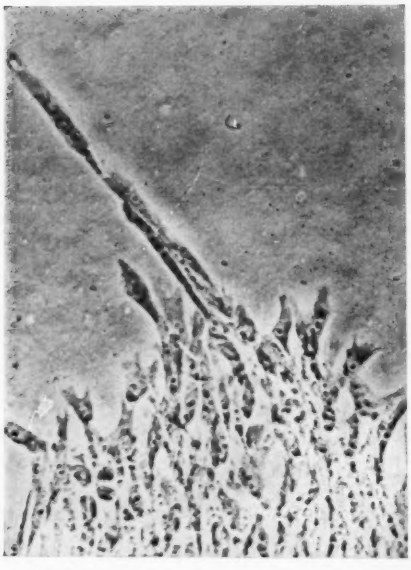


Abb. 4 und 5. Wachstumszone einer Fibroblastenkultur vor (4) und nach (5) der Kälteeinwirkung.

Kälteeinwirkung in einem deutlich geschrumpften Zustand, und zwar um so mehr, je länger diese andauerte (vgl. Abb. 4 und 5). Die Ausdehnung bzw. das Volumen der Zellausläufer wird dabei oft erheblich reduziert, und es entstehen so zwischen den normalerweise dicht aneinanderliegenden

Zellen mehr oder weniger weite Zwischenräume. Doch bleiben die Zellen über diese Interzellularräume hinweg durch auffallend viele feinste Plasmafäden miteinander verbunden. In diesem Zustand liegen die Mitochondrien und sonstigen Zellpartikel meist bewegungslos in der näheren und weiteren Umgebung des Kernes.

Bei langsamer Aufwärmung auf 38° beginnen die Zellen und ihre Ausläufer sich wieder auszudehnen, und im Laufe von 1—2 Stunden, vor allem im Plasma des distalen Zellteils, verlängern sich diese Ausläufer und neue bilden sich. Dies geschieht, indem das Plasma sowohl blasig vorquillt als auch in der Bewegungsrichtung feine plasmatische Spitzen bildet und an den Säumen undulierende Bewegungen ausführt. Das Plasma ist dabei offenbar in diesen neuen Ausläufern stärker verflüssigt und seine Oberfläche besonders plastisch. Während dieser ersten Phase befinden sich in diesen Plasmazonen höchstens ganz vereinzelt, im allgemeinen aber überhaupt keine Zellpartikel (Abb. 6). Erst nach einer gewissen Latenzzeit erlangen die Mitochondrien ihre Bewegungsfähigkeit zurück, und es beginnen nun in die neuen Ausläufer zunächst kleinere, schnell bewegliche Partikel, dann aber auch kugelige Mitochondrien und Stäbchenformen einzuwandern. Schließlich aber schieben sich auch einzelne Fadenmitochondrien in den distalen Zellteil hinein (Abb. 7—13). Sie weisen zu Beginn der Einwanderung oft eigentümliche Verdickungen auf, die sich auf der Fadenlänge verschieben können, wie wenn Perlen auf einer Schnur bewegt würden. In diesem Stadium machen auch einzelne Kugelmitochondrien einen Formwechsel zum Faden durch, indem ein- oder beidseitig des kugeligen Mitochondriums aus seiner Substanz feinste Fäden entwickelt werden, in welche im Verlauf des weiteren Formwechsels schließlich die Kugel aufgeht.

Unter dem ihnen eigentümlichen Bewegungsverhalten [6, 7] bilden solche fädigen Mitochondrien dann sehr häufig in vielen Zellen im Verlauf von etwa ¼ bis ½ Stunde lange Fadenaggregate, die sich bis in die äußersten Zellausläufer hineinschieben und sich hier manchmal gabelförmig an die äußere Plasmamembran heften.

Das Vorderende solcher einwandernden Mitochondrien ist meist verdickt und besonders beweglich. Eine Vorwärtsbewegung kommt z. B. etwa dadurch zustande, indem es über die ganze Breite des Ausläufers schwingende Bewegungen ausführt, wobei es sich unter Dünnerwerden in die Länge streckt. Solches Vorschnellen wechselt wiederholt mit schnellem Zurückweichen, so daß man oft den Eindruck einer rhythmisch wiederholten Bewegungsform gewinnt, in der das Vorderende in der Bewegungsrichtung Raum gewinnt. Schließlich schiebt sich das Hinterende mit schlängelnden Bewegungen nach.

Besonders auffallend ist aber ihr Verhalten bei der Bildung langer Fadenaggregate. Während der gleichzeitigen Einwanderung mehrerer Fäden kommt es schließlich durch schwingende „Orientierungs"- und schnellende Schlängelbewegungen, Aneinandervorbeigleiten, Hin- und Herschieben, Verschmelzungen, Bildung neuer Teilstücke und durch deren

Einwanderung in bestehende Lücken zur Formation von langen naht- und lückenlosen Fäden, die aus der Kernregion bis in die Ausläuferspitzen hineinreichen (Abb. 12, 2, 3). Während dieses ganzen Vorgangs, der infolge seiner Dynamik nur schwer beschreibend anschaulich gemacht werden kann,

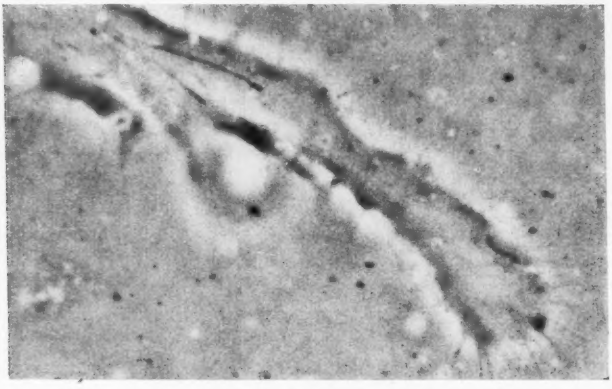


Abb. 6. Zellausläufer nach Wiedererwärmung auf 38° mit distal ausgequollenem Plasma (nachvergrößert auf 1800×).

Abb. 7.

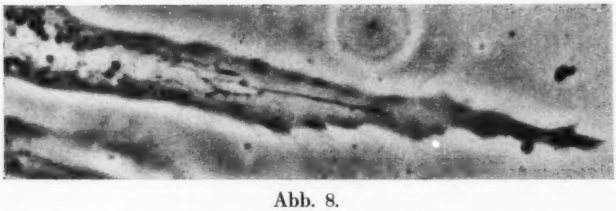


Abb. 8.

zeigen die Mitochondrien die ganze Mannigfaltigkeit ihres Bewegungsverhaltens, die an anderer Stelle eingehend analysiert worden ist [6, 7].

Die Beständigkeit solcher langen Mitochondrienfäden scheint nicht sehr groß zu sein. Nach einiger Zeit lösen sie sich nämlich wieder in ihre Teilstücke auf, die dann, meist ohne Verbindung miteinander, parallel zur

Abb. 9.

Abb. 10.

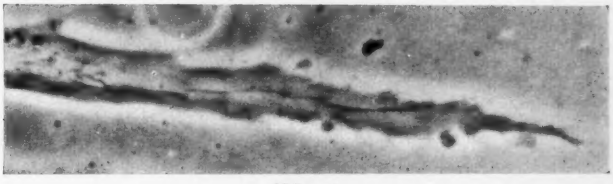


Abb. 11.

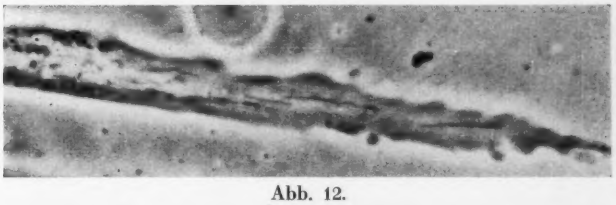


Abb. 12.

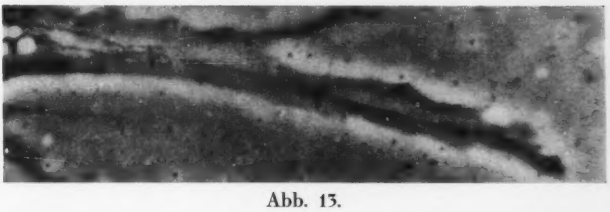


Abb. 13.

Abb. 7—13. Einwanderung von Fadenmitochondrien in einen zunächst rein plasmatischen Zellausläufer (während der Wiedererwärmung auf 38°) und Bildung von langen Fadenaggregaten (Zeitintervall zwischen den Aufnahmen je 10 Minuten) (nachvergrößert auf 1200×).

Längsachse des Ausläufers liegen bleiben. Etwa zur gleichen Zeit tritt allmählich eine Beruhigung der Zelloberfläche und damit eine Art von „Stabilisierung" der äußeren Zellform ein. Der Ablauf der nun stattfindenden Formveränderungen und Bewegungen der Zelle sowie des Mitochondrienverhaltens normalisiert sich nun auf das übliche Zeitmaß.

Gleichartige Phänomene kann man beim Studium von Fibroblasten, die ständig bei 38° gehalten sind, auch beobachten, wenn aus bisher unbekannten Gründen die Mitochondrien sich von der Zellperipherie zum Kern bewegen. Auch damit kann eine Instabilität der Zelloberfläche und die Auslösung von Zellbewegungen verbunden sein, die wieder verschwindet, wenn die Mitochondrien aus ebenso bisher unbekannten Gründen sich wieder vom Kern entfernen. Gegenüber diesen, sich aus dem normalen Zellverhalten ergebenden Phänomenen hat die oben geschilderte Methodik den Vorzug, daß mit ihr experimentell eine reversible Änderung der lokalen Mitochondriendichte herbeigeführt werden kann und die damit verbundenen Effekte studiert werden können.

Zusammenfassung

Nach mehrstündiger Abkühlung von Gewebekulturen von Fibroblasten von Hühnerembryonen auf +1° und vorsichtiger Wiedererwärmung auf 38° bilden sich an den zunächst deutlich kontrahierten Zellen der peripheren Wachstumszone neue distale Ausläufer, die bei regionaler Erschlaffung des kontraktilen Oberflächensystems des Plasmas entstehen. Nach einer gewissen Latenzzeit wandern neben anderen Zellpartikeln auch Fadenmitochondrien in die neuen Ausläufer hinein und bilden dann ziemlich regelmäßig lange Fadenaggregate, die von der Kernregion bis in die äußersten Ausläuferspitzen hineinreichen. In diesem Stadium tritt eine allmähliche Beruhigung der Zelloberfläche und damit eine Stabilisierung der Form der Zelle ein. Schließlich entsteht durch Auflösung des Aggregats in seine Teilstücke und deren diffuse Verteilung im Ausläufer wieder das übliche Bild einer Fibroblastenzelle in der Interphase.

Literatur

[1] Schneider, W. C., and G. H. Hogeboom, 1951: Cancer Research *11*, 1—22.
[2] Bourne, G. H., 1951: Cytology and Cell Physiology. Oxford Press.
[3] Nowinski, W. W., E. D. de Robertis and F. Saez, 1954: General Cytology, W. B. Saunders Company, Philadelphia and London.
[4] Lettré, H., 1951: Naturwissenschaften *38*, 490, 504, 505.
[5] Hoffmann-Berling, H., und H. H. Weber, 1953, 1954: Biochim. Biophys. Acta *10*, 628, 629; *14*, 182.
[6] Chèvremont, M., et J. Frédéric, 1952: Arch. Biol. *63*, 109.
[7] Bierling, R., 1954: Z. Krebsforsch. *60*, 31.

Die Wuchsstoffwirksamkeit von β-Naphthoxyessigsäure und Indol-3-essigsäure in gepufferten Lanolinpasten verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen

Von

Hans Linser

Aus dem Biologischen Laboratorium der Österreichische Stickstoffwerke Aktiengesellschaft, Linz a. d. Donau, Leiter: Priv.-Doz. Dr. Hans Linser

Mit 3 Textabbildungen

(Eingelangt am 13. Mai 1954)

Im Laufe der Untersuchungen zahlreicher verschiedenartiger synthetisch zugänglicher Stoffe auf ihre Wirksamkeit als zellstreckende Wuchsstoffe mit dem Pastentest (Linser 1938) ergab sich im allgemeinen kein wesentlicher Wirkungsunterschied zwischen wirksamen Stoffen mit Säurecharakter, wenn sie als freie Säure bzw. als Salz verwendet wurden. Sowohl die Salze wie auch die Säuren selbst erwiesen sich, wenn auch von zahlenmäßig verschiedener, so doch größenordnungsmäßig annähernd gleicher Wirkung. Eine auffällige Ausnahme bildete — worüber gelegentlich des Wuchsstoffsymposiums in Lund (Schweden) 1953 berichtet wurde — die β-Naphthoxyessigsäure. Diese erwies sich in Form der freien Säure als stark hemmstoffwirksam, während sie in Form ihres K- oder Na-Salzes offenbar unwirksam

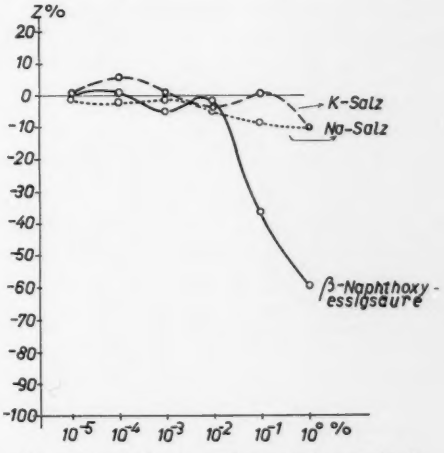


Abb. 1. Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Konzentrationen der β-Naphthoxyessigsäure in Form des Na-, des K-Salzes und der freien Säure im *Avena*-Pastentest. (Mittelwerte aus je drei- bis viermal wiederholten Ansätzen zu je ca. 30 Testpflanzen pro Ansatz.)

erschien (Abb. 1). Um sicher zu sein ,daß ein und dieselbe Substanz je nach ihrer Form als Säure oder als Salz diese Verschiedenheit der Wirkung besitzt, wurde aus einer einzigen Herstellungscharge stammendes β-naphthoxyessigsaures Kalium zur freien Säure umgearbeitet und aus dieser wiederum das Kaliumsalz und von diesem nochmals freie Säure hergestellt[1] und getestet. Es ergab sich dabei jeweils Wirksamkeit der freien Säure und annähernde Unwirksamkeit des K-Salzes. Der Wirksamkeitsunterschied konnte also nur durch den Unterschied zwischen der Salzform und der Säureform der Wirkstoffe bedingt sein. Danach war es von Interesse festzustellen, wie sich die beiden genannten Formen der β-Naphthoxyessigsäure bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen im wäßrigen Anteil der Paste verhalten würden.

Über die Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration auf das Zellstreckungswachstum berichtet schon S. Strugger (1932, 1934). Er sowie J. Bonner (1934) konnten zeigen, daß Koleoptilzellen in Pufferlösungen von pH 4,0 eine vielfach größere Zellstreckung aufweisen als im annähernd neutralen Milieu (pH 7,3), woraus Bonner den Schluß zog, daß nur das freie, undissoziierte Wuchsstoffmolekül wirksam sei; doch konnte F. Brecht (1936) zeigen, daß Wuchsstoff- und Säurewirkung bei dem Zellstreckungsvorgang zeitlich verschieden eintreten und offenbar nicht ursächlich miteinander verknüpft sind. Van Santen (1938) zeigte, daß der pH-Einfluß auf die Zellstreckung im Bereich von pH 4,2 bis 5,8 der Titrationskurve der Wuchsstoffdissoziation entspricht, dies oberhalb von pH 5,8 nicht mehr der Fall ist und unterhalb pH 4,18 eine Schädigung des Zellgewebes eintritt. Hierzu berichtet R. Pohl (1948) auf Grund eigener Versuche, daß die Streckung der Koleoptilzylinder bei niedrigem pH-Wert, hoher Pufferkonzentration und bei geringer eigener Pufferungskapazität der Zellen am größten ist, daß aber unterhalb von pH 4,3 eine Hemmung des Zellstreckungswachstums einsetzt. H. Weygand u. B. Wehnelt (1942) beobachteten, daß die Zugabe saurer Salze den wurzelbildenden Effekt von Wuchsstoffen steigert, und auch H. Söding (1952) gibt an, daß die Wurzelbildung bei pH 4,2 optimal verlaufe sowie auch, daß bei saurem pH mit Wuchsstoffen an Koleoptilen stärkere Krümmungen erzielt werden. Ebenso betrachtete J. Rietsema (1949) bei der *Avena*-Koleoptile ein pH-Optimum des Zellstreckungswachstums bei 4,2, doch wurde dieses durch Indol-3-essigsäure auf 4,8 bis 5,2 verschoben und bei längerer Versuchsdauer sogar auf 5,6 bis 6,0. Schließlich wies E. W. Simon (1950), der ganz allgemein für mehrere Wirkstoffsysteme zeigte, daß die zur Erzielung eines Standard-Effekts nötige Wuchsstoffkonzentration, falls es sich um eine schwache Säure handelt, bei niedrigen pH-Werten kleiner ist als bei hohen Werten und die undissoziierten Moleküle wirksamer erscheinen als die dissoziierten, daraufhin, daß der volle Einfluß des pH-Wertes auf den biologischen Testeffekt überall da markiert ist bzw. sein kann, wo ein Wirkstoff aus einer kleinen gepufferten Substanzmenge in eine größere Menge von Zellen aufgenommen wird und erst nach einem längeren Transport von Zelle zu Zelle (also unter rein physiologischen pH-Verhältnissen) zur Wirkung kommt bzw. den Effekt hervorruft. Nach diesen Ergebnissen war nicht ohne weiteres zu erwarten, in welcher Weise bei Verwendung der Pastenmethode der pH-Wert der wäßrigen Phase der Paste von Einfluß auf die Wirksamkeit der getesteten Substanz

[1] Für die Herstellung der β-Naphtoxyessigsäure-Produkte danke ich Herrn Dr. O. Schmid.

sein würde, und es war daher auch aus diesem Grunde von Interesse, Untersuchungen mit auf bestimmte pH-Werte gepufferten Pasten durchzuführen.

Zu diesem Zwecke wurden verschiedenartige Pasten hergestellt, welche aus gleichen Gewichtsteilen Wollfett und Pufferlösung durch inniges Verreiben beider Mischungskomponenten hergestellt wurden. Die freie Säure des betreffenden, zur Testung gelangenden Wirkstoffes wurde dabei in eingewogener Menge dem Wollfett beigemischt und durch Verrühren und Erwärmen darin gelöst. Dies geschah so, weil die freie Säure sich im wäßrigen Anteil der Paste nur sehr schwer auflöste. Die Salzformen der Wirkstoffe dagegen lösten sich leicht in der Pufferlösung und wurden deshalb vor dem Verrühren der Paste dieser beigegeben. Bei dem nach Erwärmen auf etwa 60° C erfolgten, lange währenden Verrühren zur Lanolinpaste und dem anschließenden Stehenlassen der Paste kann angenommen werden, daß sich bis zur Testung ein den jeweiligen Löslichkeiten entsprechendes Verteilungsgleichgewicht in der Paste eingestellt hatte, welches die in der lipoiden wie in der wäßrigen Phase der Paste vorliegenden Wirkstoffkonzentrationen bestimmte.

Als Pufferlösungen wurden Gemische der beiden Komponenten des McIlvaine-Zitronensäure-Phosphatpuffers benützt, deren Zusammensetzung die folgende war:

Lösung A: 0,2 m Na_2HPO_4; Lösung B: 0,1 m Zitronensäure.

Die den Mischungen entsprechenden pH-Werte sind in den Tab. 1 und 2 eingetragen.

Tab. 1. *Koleoptilzuwachs während 24 Stunden Versuchsdauer unter dem Einfluß auf verschiedene pH-Werte gepufferter Lanolinpasten (ohne Wirkstoffzusatz; Mittelwerte aus vier Versuchsreihen):*

pH-Wert:	3,65	4,31	5,29	6,21	7,11	8,03
mm:	27,3	26,7	28,3	27.4	26,9	25,2
mittlerer Fehler:	±1,6	±1,6	±1,8	±2,2	±2,0	±2,0
Mittelwert aller pH-Proben:			27,0±0,5			

Tab. 2. *β-Naphthoxyessigsäure (in Äther gelöst, mit Wollfett vermischt, Äther abgedampft, Wollfett 1 : 1 mit m/15 Zitronensäure-Phosphatpuffer nach McIlvaine zu Lanolinpaste verrieben).*

Werte für Z% im Pastentest (Linser 1938).

Konzentration in %: / Pufferlösung:	10^{-2}	10^{-1}	10^{0}
pH 3,65	+1,1	−14,3	−61,8
pH 4,31	+0,3	−26,1	−58,9
pH 5,29	−2,8	−37,7	−64,5
pH 6,21	−8,3	−15,5	−59,0
pH 7,11	+2,3	+0,8	−61,3
pH 8,03	+5,3	+8,9	−58,9

Zunächst zeigte sich, daß die auf verschiedene pH-Werte gepufferten Pasten in Abwesenheit von zellstreckenden Wirkstoffen (erwartungsgemäß) keinen signifikanten Einfluß auf das Zellstreckungswachstum der Haferkoleoptilen ausüben. Nur bei pH 8,03 ist eine geringfügige Verzögerung des Koleoptilwachstums zu bemerken, welche etwa 10% des Normalzuwachses bei niedrigeren pH-Werten beträgt.

Die Z%-Werte der verschieden gepufferten wuchsstoff- bzw. hemmstoffhaltigen Pasten wurden jeweilig auf die zu gleichem pH-Wert gepufferten Lanolinpasten-Werte bezogen und in Prozenten von deren Normalzuwachs während der Versuchsdauer bezogen.

Die mit freier β-Naphthoxyessigsäure bei verschiedenen pH-Werten der Pufferlösungen in den Pasten erhaltenen Werte für Z% (Koleoptilzuwachs

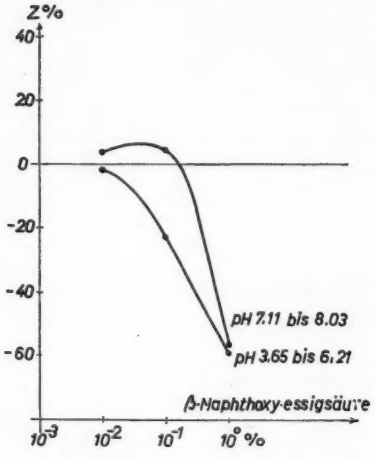


Abb. 2. β-Naphthoxyessigsäure (freie Säure), Mittelwerte für Z% bei sauer gepufferten (untere Kurve) und neutral bzw. alkalisch gepufferten Pasten (obere Kurve).

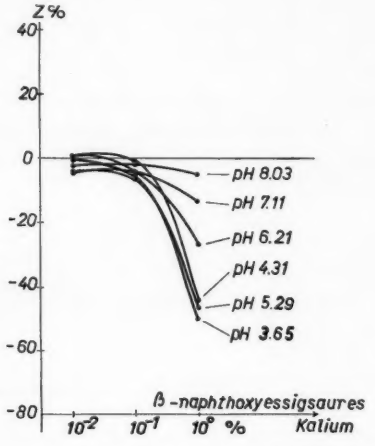


Abb. 3. Kaliumsalz der β-Naphthoxyessigsäure, Werte für Z% bei auf verschiedene pH-Werte gepufferten Pasten.

während der 24stündigen Versuchsdauer in Prozenten des gleichzeitigen Zuwachses der ohne Wirkstoffzusatz behandelten Kontroll-Koleoptilen) sind in Tab. 2 zusammengestellt. Es handelt sich dabei um Mittelwerte, welche aus einer zweifach wiederholten Versuchsserie (von je ca. 30 Pflanzen pro Versuchsglied) erhalten wurden. Die Übereinstimmung beider Serien untereinander war zahlenmäßig bei der Konzentration 10^0% am besten; bei getrennter Auswertung zeigten beide Serien analoge Ergebnisse. Aus ihnen geht hervor, daß Pufferung auf saure pH-Werte schon in kleineren Konzentrationen starke Hemmwirkungen der β-Naphthoxyessigsäure bedingt, während bei neutraler bzw. alkalischer Pufferung die Konzentrationen 10^{-1} und 10^{-2}% noch keine Hemmwirkung erkennen lassen. Erst bei 10^0% zeigt

bei neutralem oder alkalischem pH auch die in freier Form in die Paste eingebrachte β-Naphtoxyessigsäure eine fast ebenso starke hemmende Wirkung wie bei sauren pH-Werten (Abb. 2).

Die entsprechenden Werte für die verschiedenen Konzentrationen des Kaliumsalzes der β-Naphthoxyessigsäure bei verschiedenen pH-Werten sind der Abb. 3 zu entnehmen und zeigen, daß der Wirkstoff um so mehr seine Hemmwirkung auch bei 10°% verliert, je mehr der pH-Wert sich dem alkalischen Bereich nähert, bis schließlich bei pH 8,03 fast keine Hemmwirkung mehr vorhanden ist (Abb. 4).

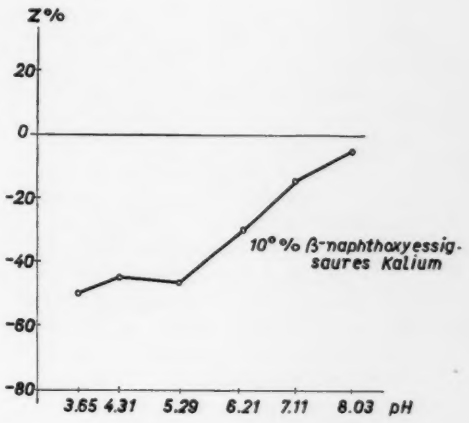


Abb. 4. Abhängigkeit der Hemmungswirkung von 10°% β-naphthoxyessigsaures Kalium in Lanolinpasten von verschiedenen pH-Werten der wäßrigen Phase.

Um auch das Verhalten eines Wuchsstoffes neben dem eines Hemmstoffes kennenzulernen, wurde in gleicher Weise wie mit der β-Naphthoxyessigsäure mit der (freien) Indol-3-essigsäure eine Versuchsserie durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 5 graphisch dargestellt. Bei den niedrigen pH-Werten (3,65; 4,31) ergaben sich Konzentrations-Wirkungskurven mit einem ausgeprägten Wirkungsoptimum (bei etwa 10^{-2}%). Sie lassen bei der Konzentration $3 \cdot 10^{-1}$% deutlich die Wirkung der Hemmungskomponente der Indol-3-essigsäure erkennen. Bei den höchsten pH-Werten (7,11; 8,03) dagegen liegt kein deutliches Optimum, sondern eine S-Form der Kurve vor, welche, falls man sie zur Optimumskurve ergänzend extrapolieren dürfte, ein Optimum nicht unterhalb von 10^{-1}% zeigen könnte. Dies zeigt, daß im alkalisch gepufferten Bereich die Hemmungskomponente der Indol-3-essigsäure viel weniger stark in Erscheinung tritt als im gepufferten Bereich. Die fördernde

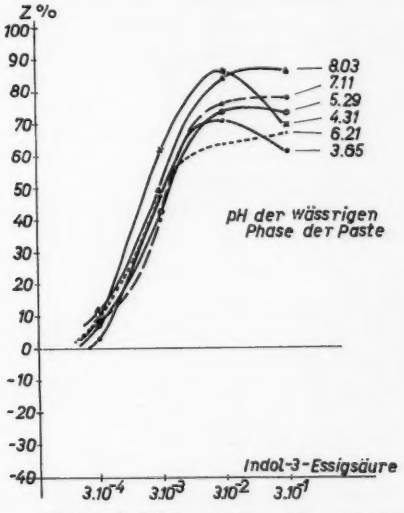


Abb. 5. Indol-3-essigsäure (freie Säure), Werte für Z% bei auf verschiedene pH-Werte gepufferten Pasten.

Wirkung auf das Zellstreckungswachstum wird offenbar vom pH-Wert der wäßrigen Phase in der Paste weniger beeinflußt als die hemmende Komponente.

Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit verschiedenen Beobachtungen an sonstigen Wuchsstoffen (Linser 1954), bei welchen die freien Säuren vergleichend neben ihren Salzen getestet wurden, wobei stets die freien Säuren ausgeprägtere Wirkungsoptima, also stärkere Hemmungskomponenten zeigten als die entsprechenden Alkalisalze, und zwar nicht nur beim Vergleich der in Prozenten angegebenen, sondern auch beim Vergleich molarer Konzentrationen.

Es darf nun (auf Grund des Massenwirkungsgesetzes) angenommen werden, daß ein um so größerer Anteil des Kaliumsalzes der β-Naphthoxyessigsäure in dissoziierter Form vorliegt, je geringer der Säuregrad der verwendeten Pufferlösungen gewählt wird. Unter dieser Voraussetzung würde die Hemmwirkung also der undissoziierten Form des K-Salzes bzw. der Säure zuzuschreiben sein. Es wäre nun jedoch nicht gerechtfertigt, anzunehmen, daß auch innerhalb der Zelle bzw. des Protoplasmas nur der undissoziierten Form Hemmwirksamkeit zukomme, denn das durch die Pufferlösung im pH bestimmte Milieu endet an der Zellgrenzschicht, so daß es nur den Übertritt des Moleküls in diese, nicht mehr aber sein Verhalten innerhalb des lebenden Systems direkt zu beeinflussen vermag (vgl. E. W. Simon, 1950).

Zusammenfassung

Bei Testung auf Zellstreckungswirkung von β-Naphthoxyessigsäure und ihrem Kaliumsalz in Lanolinpasten mit auf verschiedene pH-Werte gepuffertem wäßrigen Anteil zeigte die Form der freien Säure eine starke Hemmungsaktivität im sauren Bereich und eine nur geringe im alkalischen Bereich. Das K-Salz zeigte nur im sauren Bereich eine starke Hemmungsaktivität, welche sich bei Annäherung an den Neutralpunkt immer mehr vermindert und im alkalischen Bereich fast völlig verschwindet. Auch die Indol-3-essigsäure besitzt im sauren Bereich eine stärkere Hemmungskomponente als im alkalischen. Es ist zu vermuten, daß die Hemmungskomponente an die Aufnahme der undissoziierten Form des Wirkstoffs durch die Zellgrenzschicht gebunden ist.

Literatur

Bonner, J., 1934: The relation of hydrogenions to the growth rate of the *Avena*-coleoptile. Protoplasma *21*, 335.

Brecht, F., 1936: Der Einfluß von Wuchsstoff- und Säurepasten auf das Wachstum von *Avena*- und *Helianthus*-Keimlingen und seine Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt der Luft. Jb. wiss. Bot. *82*, 581.

Linser, H., 1938: Zur Methode der Wuchsstoffbestimmung. Planta *28*, 227—265.
— 1954: Chemische Konstitution und Zellstreckungswirkung verschiedener Stoffe. Versuch einer allgemeinen Wirkstoffhypothese. Mh. Chemie *85*, 196—226.

Pohl, R., 1948: Ein Beitrag zur Analyse des Streckungswachstums der Pflanzen. Planta *36*, 230—261.

Rietsema, J., 1949: Über den Einfluß des pH auf das Wachstum von Koleoptilstücken von *Avena*. Proc. kon. nederl. Akad. Wetensch. *52*, 1039—1050.

Santen, A. M. van, 1938: Influence of hydrogenion concentration on the growth rate of *Avena*-coleoptile. Proc. Roy. Acad. Amsterd. *41*, 513.

Simon, E. W., 1950: Effect of pH on the biological activity of weak acids bases. Nature (London) *166* (4217), 343—344.

Söding, H., 1952: Die Wuchsstofflehre.

Strugger, S., 1932: Die Beeinflussung des Wachstums und des Geotropismus durch die Wasserstoffionen. Ber. dtsch. Bot. Ges. *50*, 74.

— 1934: Beiträge zur Physiologie des Wachstums. I. Zur protoplasmaphysiologischen Kausalanalyse des Streckungswachstums. Jb. wiss. Bot. *79*, 406.

Zur Bedeutung der Adenosintriphosphorsäure für Formkonstanz und Formänderungen von Zellen

Von

Hans Lettré und **Annelies Schleich**

Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg

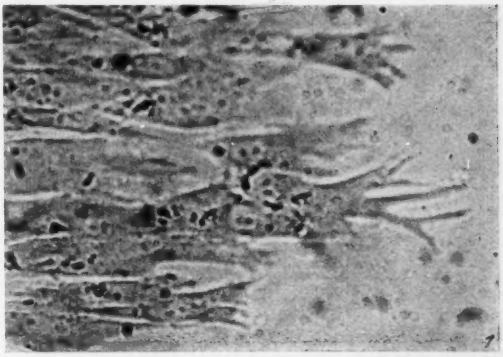
Mit 19 Textabbildungen

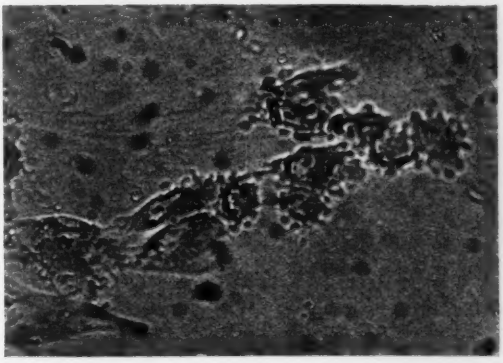
(Eingelangt am 30. Juni 1954)

1951 machten wir die Beobachtung [1], daß bei Fibroblasten (24 Stunden in vitro gewachsen) nach Zusatz des Farbstoffs Viktoriablau feine Oberflächenbewegungen beginnen, die in stärkere Plasmabewegungen übergehen (siehe Abb. 1—3). Diese Bewegung findet bei allen Zellen statt, in die der Farbstoff eingedrungen ist, und die Fibroblasten zeigen so in Teilungsruhe eine Plasmabewegung wie sonst nur im Stadium der Mitose und der Plasmateilung. Der Farbstoff färbt und verklumpt zunächst die Mitochondrien, erst später tritt er auch in den Zellkern über. Die Mitochondrien sind als Träger von Oxydationsfermenten bekannt [2], und die selektive Anfärbung der Mitochondrien korrespondiert mit einer Hemmung der Atmung der Zellen. Eine Inhibierung der Atmung durch Viktoriablau ist schon früher beschrieben worden [3] und wurde von uns in unabhängigen Versuchen bestätigt. Auf Grund dieser Wirkung wurden andere Atmungsgifte untersucht und auch mit ihnen die gleiche Bewegungsauslösung erzielt [4].

In vorhergehenden Versuchen hatten wir uns, angeregt durch die Hypothese von Brachet [5], daß Adenosintriphosphorsäure (ATP) die energieliefernde Substanz bei der Zellteilung sei, mit der Bedeutung dieser Substanz bei der Mitose beschäftigt. Wir fanden, daß die zellteilungshemmende Wirkung des Colchicins durch ATP aufgehoben werden kann [6] und daß Stoffe, welche nach ihren Eigenschaften den ATP-Haushalt der Zelle stören oder als Muskelgifte wirken, die Wirksamkeit des Colchicins verstärken [7]. Aus diesen Feststellungen heraus lag es nahe, auch die oben erwähnten Plasmabewegungen mit der ATP in Beziehung zu bringen. Üblicherweise ordnet man einer Bewegung wie etwa der Muskelkontraktion ein Mehr an ATP zu. Die chemischen Eingriffe, welche durch Atmungshemmung hier eine Bewegungsauslösung bedingen, vermindern jedoch nach allen bio-

chemischen Erfahrungen durch die Hemmung der Atmung die Produktion an ATP. Demgemäß kann die Bewegungsauslösung nur so verstanden werden, daß die Zelloberfläche sich schon in einem Zustand der Kontraktion befindet und daß die Bewegung hier nur durch ein partielles Lösen der Kontraktion der Zelloberfläche gedeutet werden kann, also durch den Übergang eines Tonus der Zelloberfläche in eine lokale Erschlaffung, die wieder von Kontraktionen gefolgt wird. Unter dieser Annahme müßte man die Bewegungsauslösung mit Hilfe von ATP (als Folgeprodukt der Atmung) unterdrücken können. In der Tat kann man mit einer Mischung von ATP-Natrium und Viktoriablau die Zellen trotz einer Anfärbung mit dem Farbstoff für längere Zeit in Formkonstanz halten [1]; da das zugesetzte ATP nach und nach in Adenosin-di- und mono-phosphat und ihre Folgeprodukte gespalten wird, tritt nach einiger Zeit, je nach der Dosis in 1—2 Stunden, dann die Zellbewegung auf, die mit Viktoriablau allein in einem durch die Eindiffusion





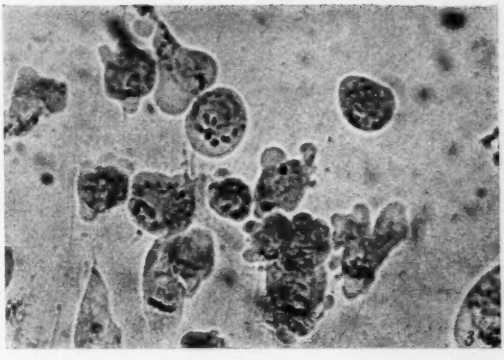


Abb. 1—3. Fibroblasten nach Zusatz von Viktoriablau. Abb. 1. 5 Min. nach Zugabe; normales Bild. Abb. 2. 10 Min. nach Zugabe; Stadium der beginnenden Oberflächenbewegung. Abb. 3. 25 Min. nach Zugabe; alle Zellen abgerundet, lebhafte Plasmabewegungen.

begrenzten Zeitraum von 10—20 Minuten beginnt. Hier wird also durch ATP nicht, wie man es von der Muskelkontraktion erwarten würde, eine Bewegung ausgelöst, sondern im Gegenteil unterdrückt.

Die sich nur in geringem Umfang ändernde Oberfläche eines Fibroblasten im Ruhezustand befindet sich demgemäß nicht in einem statischen Zustand der Ruhe und Untätigkeit, sondern in einem Kontraktionszustand, einem Tonus, zu dessen Aufrechterhaltung der Stoffwechsel der Zelle die ausreichende Menge an ATP produzieren muß. Dies geschieht bei einer aerob lebenden Zelle durch die Atmungsprozesse, wobei pro Molekel umgesetzter Glukose bis zu 38 Molekel ATP gebildet werden können. Bei anaeroben Prozessen werden wesentlich geringere Mengen ATP gebildet, und eine Formkonstanz der Zellen kann also anaerob nur bestehen, wenn durch entsprechend vermehrten Glukoseumsatz eine adäquate ATP-Produktion erzielt wird. Auf dem Umweg über die ATP entscheidet so der Stoffwechsel über die Zellform, die demgemäß nicht nur ein durch Strukturen, sondern auch durch den Zellstoffwechsel bedingtes Phänomen ist. Bei Zellen ohne Formkonstanz wie Protozoen ist nach einer Hypothese von Goldacre und Lorch [8] ebenfalls eine Teilkontraktion der Zelloberfläche durch ATP als Ursache des Formwandels anzunehmen. Formänderung ergibt sich so allgemein als Resultat von lokalen Kontraktionsunterschieden der Zelloberfläche, Formkonstanz als ein Gleichgewicht der Kontraktion der Zelloberfläche, wobei die topographische Verteilung der Kontraktion an der Zelloberfläche die Gesamtform der Zelle bestimmt und zugleich strukturelle Elemente in ihrer Verteilung Bedeutung haben. Die Formkonstanz der Zelle ergibt sich weiter als abhängig von der Anwesenheit und der lokalen Dichte von Mitochondrien, die als Produzenten von ATP angesehen werden müssen. Diese Frage wird in der folgenden Arbeit von R. Bierling [9] erörtert. Neben dem Fall der Gesamtkontraktion der Oberfläche käme für die Formkonstanz auch noch der Grenzfall der Gesamterschlaffung in Betracht, d. h. eine Bewegungslosigkeit durch starke Minderung der ATP-Menge, Zustände, wie man sie an geschädigten, abgekugelten Fibroblasten beobachten kann. Im Grenzfall des Fehlens von ATP bedeutet dies eine Instabilität der Zelle, die meist zum Zellzerfall führt.

Aus der Analogie im Erscheinungsbild der Plasmateilung von Fibroblasten (siehe Abb. 12—15) mit dem der induzierten Plasmabewegungen wurde auf eine Inaktivierung der Mitochondrien während der Mitose geschlossen. Demgemäß müßte anschließend an die erfolgte Plasmateilung bei der Wiederausbildung einer formkonstanten, spindelförmigen Zelle eine Reaktivierung der Mitochondrien vor sich gehen. Folgendes Experiment läßt sich als Beweis hiefür heranziehen: wie oben erwähnt, kann durch ATP die Wirkung des Viktoriablau für einige Zeit aufgehoben werden. In dieser Zeitspanne laufen noch Zellteilungen vollständig ab. Wir haben Zeitrafferaufnahmen von solchen Zellteilungen gemacht, die gerade in dem Zeitpunkt des Übergangs in die zweite Phase, erkenntlich an dem Bewegungsbeginn der Oberfläche von Ruhezellen, abgelaufen waren. Zu diesem Zeitpunkt macht sich nun die durch das Viktoriablau

bewirkte Inaktivierung der Mitochondrien bemerkbar, d. h. in diesem Fall wird ihre Reaktivierung verhindert, und demgemäß verharren diese Zellen im Zustand ständiger Plasmabewegung. Im Gegensatz zu den im Anfang

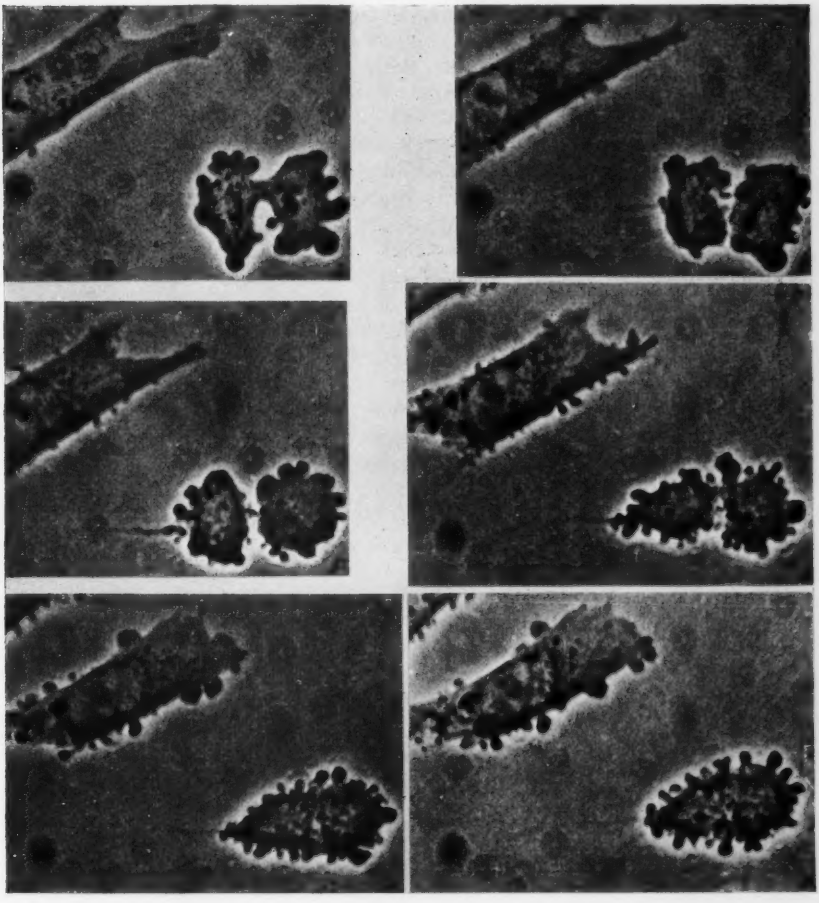


Abb. 4—9. Einzelbilder aus Zeitrafferfilmaufnahmen von Fibroblasten mit Zusatz von 40 γ/ml Viktoriablau und 1,5 mg/ml ATP-Na. Abb. 4: 1 Stunde nach Zusatz, Abb. 5: nach weiteren 10 Min., Abb. 6: nach 20 Min., Abb. 7: nach 33 Min., Abb. 8: nach 63 Min., Abb. 9: nach 73 Min.

beschriebenen Versuchen wird hier nicht eine Bewegung ruhender Zellen ausgelöst, sondern Zellen im Bewegungszustand werden daran gehindert, wieder in Zellen mit Formkonstanz überzugehen. Die Abbildungen 4—9

aus einem Zeitrafferfilm veranschaulichen diese Beobachtungen. In Abb. 4 ist in der linken oberen Ecke eine Ruhezelle mit im wesentlichen glatter Oberfläche zu erkennen und unten rechts eine eben vollendete Plasmateilung. Auf den folgenden Abbildungen 5—9 in verschiedenen Zeitabständen sieht man, wie die Ruhezelle zunehmend Oberflächenbewegung zeigt, während die gerade geteilten Zellen mit ihrer Oberfläche über einen Zeitraum der Filmaufnahmen von 1½ Stunden in Bewegung bleiben.

Im vorigen Jahr haben Hoffmann-Berling und Weber [10] das sogenannte Zellmodell beschrieben, d. h. mit Glycerin-Wasser extrahierte Zellen, die ähnlich wie das analog herstellbare Muskelmodell von allen löslichen Fermentsystemen und auch von ATP befreit sind. Diese Zellmodelle kontrahieren sich nun beim Zusatz von ATP und sind daher geeignet, die Fähigkeit der Zelloberfläche zur Kontraktion mit ATP direkt zu demonstrieren. Zellmodelle von Fibroblasten haben ihre Spindelform beibehalten und kugeln sich mit ATP ab. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu dem Verhalten lebender Fibroblasten, die mit ATP keine Veränderung der Spindelform [11], mit hohen Dosen eine reversible Starre unter Erhaltung der Spindelform zeigen. In Abb. 10 ist die Abhängigkeit des Kontraktionsgrades des Zellmodells von Fibroblasten von der Konzentration an ATP nach Hoffmann-Berling wiedergegeben. Man ersieht hieraus, daß schon mit Mengen unter einer Konzentration von 1 Millimolar Kontraktion beginnt, die sich bei Erhöhung über 1 Millimolar nicht mehr vermehrt. Die Konzentration an ATP in lebenden Zellen kann man auf 1—2 Millimolar ansetzen; bei der Herstellung des Zellmodells aus einer lebenden Zelle wird die ATP-Menge auf Null gebracht. Hiebei behalten die Fibroblasten aber ihre Spindelform. Bei Übereinstimmung von Zellmodell und lebender Zelle sollte man nun durch Wiederzugabe von ATP die Rückkehr in den Ausgangszustand, d. h. das Formgebilde erwarten, das bei der Ausgangskonzentration von ATP vorlag. Das Zellmodell behält hiebei aber nicht seine Spindelform bei, sondern kugelt sich ab, erweist sich also als irreversibel. Das Zellmodell eines Fibroblasten mit Spindelform ohne ATP muß als eine „Metamorphose" des lebenden Fibroblasten angesehen werden, die einem Zustand entspricht, der nicht mit der lebenden Zelle vergleichbar ist. Bei den Zellmodellen besteht ein Verlust der topographischen Verteilung der Kontraktilität, der zum Teil durch die Ausschaltung der Mitochondrien in diesem System bedingt sein kann. Bedeutsam ist ferner der Unterschied, daß das Zellmodell vom ATP-Gehalt Null durch Übergang zu höherem ATP-Niveau abgekugelt wird, während bei der lebenden Zelle diese Formänderung umgekehrt mit dem Übergang von höherem zu niederem ATP-Niveau verknüpft ist. Daher sind Schlußfolge-

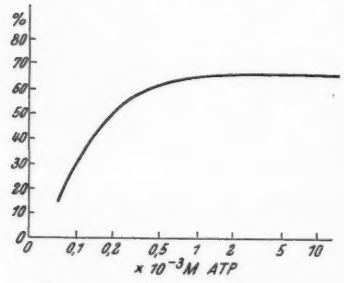


Abb. 10. Abhängigkeit der Kontraktion (relative Verkürzung) eines Zellmodells von der Konzentration an ATP.

rungen über das Kontraktionsverhalten von lebenden Zellen aus dem Zellmodell nur mit Vorsicht zu treffen. In Abb. 11 ist schematisch dar-

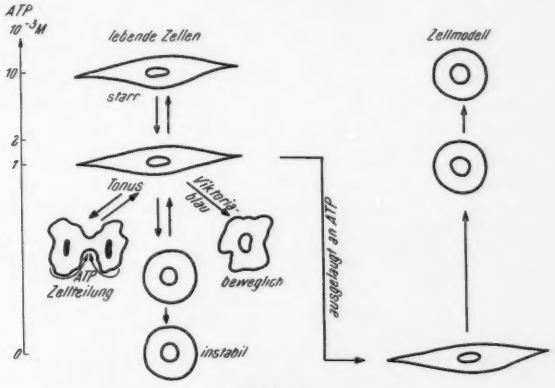


Abb. 11.

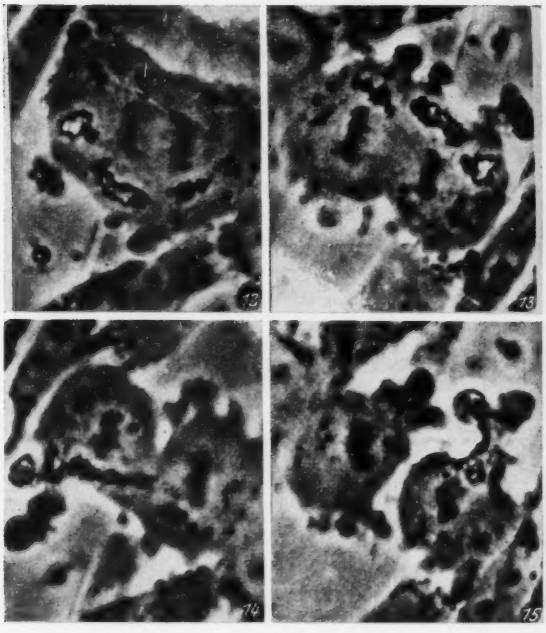


Abb. 12—15. Fibroblast in unbeeinflußter Zellteilung; starke Plasmabewegung.

gestellt, wie sich die verschiedenen Wege von der lebenden Zelle zum Zellmodell und analoge Wege an der lebenden Zelle unterscheiden.

Aus dem Bewegungsverhalten der lebenden Zellen bei Änderung der Stoffwechselsituation wurden von uns auch Schlußfolgerungen über die Stoffwechselsituation während der Mitose gezogen [1]. Es wäre danach eine Atmungssistierung, d. h. eine Inaktivierung der Mitochondrien während der Zellteilung anzunehmen. Mit dieser Annahme stehen Messungen der Sauerstoffaufnahme an sich synchron teilenden Objekten in Übereinstimmung (Erickson [12], H. Stern [13], Zeuthen [14]). Selbstverständlich wird für die Bewegungen und Einschnürungen während der Mitose ATP benötigt, und lokale Verschiebungen im ATP-Niveau an Stel-

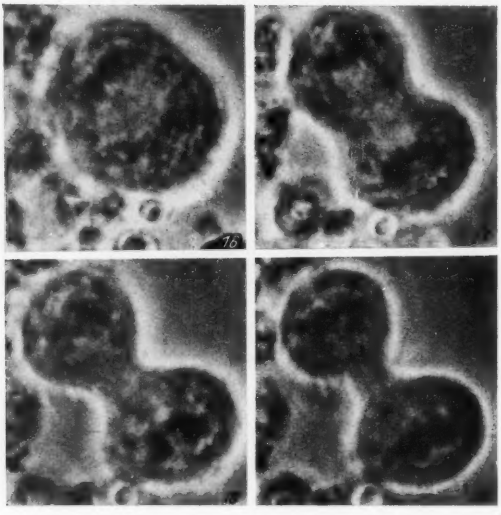


Abb. 16—19. Zelle des Yoshida-Sarkoms der Ratte in unbeeinflußter Zellteilung; Durchschnürung ohne Plasmabewegung.

len erhöhten ATP-Bedarfs geben so das Bild der sich einerseits bewegenden, andererseits sich durchschnürenden Zelle. Zellarten, die im Zustande der Teilungsruhe Formkonstanz haben und in der Teilung lebhafte Bewegung zeigen (siehe Abb. 12—15), stehen Zellarten mit entgegengesetztem Verhalten gegenüber. Wir beschäftigen uns zur Zeit mit Zellen des Yoshida-Sarkoms der Ratte [15], die nach Beobachtungen in vitro während der Teilungsruhe lebhafte Plasmabewegungen durchführen und zur Teilung hin sich in eine sich durchschnürende Kugel mit glatter Oberfläche verwandeln (siehe Abb. 16—19).

Die Annahme der Mitochondrien-Inaktivierung während der Zellteilung und ihrer Reaktivierung nach der Teilung führt noch zu einer neuartigen Beleuchtung des Problems der Koordinierung von Kernteilung und Plasmateilung. Die Bildung einer zweikernigen Zelle ergibt sich als Ablauf der Kernteilung (mitotisch [16] oder amitotisch) bei ausbleibender Plasmatei-

lung. Man kann das Ausbleiben der Plasmateilung als Hemmung eines für dieses Phänomen notwendigen chemischen oder strukturellen Systems auffassen, wie es bisher geschah. Dasselbe Erscheinungsbild würde sich aber auch aus einer Störung der Koordinierung der Mitochondrienaktivität, z. B. einer vorzeitigen Reaktivierung der Mitochondrien ergeben. Während die erste Auffassung einen negativen Einfluß, eine Zellschädigung, postuliert, wird durch die zweite eine gleichartige Wirkung eines positiven Effektes, eine Reaktivierung eines inaktiven Zustandes angenommen. Beide Möglichkeiten können auftreten und müssen nur von Fall zu Fall entschieden werden.

Die 1951 aus den Beobachtungen an lebenden Zellen abgeleitete Vorstellung über die Kontraktilität der Zelloberfläche durch ATP und die Auffassung einer formkonstanten Zelloberfläche als tonusartiger Zustand läßt zwanglos die Deutung der Mannigfaltigkeit der Erscheinungsformen bei verschiedenen Zellarten, Zellformen und Zellzuständen als Variationen der lokalen Kontraktionszustände der Zelloberfläche zu.

Herrn A. Mayer danken wir für seine Hilfe bei der Herstellung der Filmaufnahmen und Mikrophotographien.

Literatur

[1] Lettré, H., 1951: Naturwiss. *38*, 490.
[2] Schneider, W. C., und G. H. Hogeboom, 1951: Cancer Research. *11*, 1.
[3] Hayashi, J., 1936: Zeitschr. exper. Med. *99*, 689.
[4] Lettré, H., M. Albrecht und R. Lettré, 1951: Naturwiss. *38*, 504, 505.
[5] Brachet, J., Embryologie chimique. Paris 1947.
[6] Lettré, H., und M. Albrecht, 1951: Naturwiss. *38*, 547.
[7] — R. Lettré und Ch. Pflanz, 1950: Naturwiss. *37*, 378, 563.
— — — 1951: Naturwiss. *38*, 13, 214.
— — — 1950—1951: Z. physiolog. Chem. *286*, 138, 212; *287*, 33, 150.
[8] Goldacre, R. J., und I. J. Lorch, 1950: Nature (London) *166*, 497.
[9] Bierling, R., 1954. Protoplasma *44*, 299.
[10] Hoffmann-Berling, H., 1954: Biochim. Biophys. Acta *14*, 182.
— und H. H. Weber, 1953: Biochim. Biophys. Acta *10*, 628, 629.
[11] Lettré, H., 1952: Naturwiss. *39*, 266.
[12] Erickson, R. O., 1947: Nature (London) *159*, 275.
[13] Stern, H., 1948: J. General Physiology *31*, 243.
[14] Zeuthen, E., 1951: Publ. Stat. Zool. Neapel *23*, 47.
[15] Vgl. Zusammenfassung: Lettré, H., 1953: Zeitschr. f. Krebsforschg. *59*, 287.
[16] Schleich, A., und A. Mayer, 1954: Zeitschr. f. Krebsforschg. *60*, 47.

Beobachtungen an Protoplasma und Chloroplasten der Alge *Netrium digitus* (Ehrenberg) bei Kultur unter Lichtabschluß

Von

Dr. **Oskar Kopetzky-Rechtperg**, Wien

Mit 1 Textabbildung

(Eingelangt am 7. Mai 1954)

Die Veröffentlichung der folgenden, an Protoplasma und Chlorophyllkörper der Alge *Netrium digitus* (Conjugatae, Desmidiales) bei Lichtentzug gemachten Beobachtungen erfolgt, obwohl über solche Experimente mit fadenförmigen Konjugaten und mit höheren Pflanzen schon eine Anzahl von Arbeiten meist älteren Datums vorliegen. Aus diesem Grunde konnte auch die Anführung der entsprechenden Literatur auf das Notwendigste beschränkt werden. Meine Ergebnisse wurden durch mikroskopische Betrachtung unter Anwendung einzelner einfacher mikrochemischer Reaktionen gefunden, ohne Zuhilfenahme der in den pflanzenphysiologischen Instituten derzeit verwendeten Untersuchungsmethoden, wie Plasmolyse, Vitalfärbung, Permeabilitätsuntersuchung etc. Der Umstand, daß *Netrium digitus* infolge einer eigenartigen Formation seines wandständigen Protoplasmas unter den Desmidiales bis jetzt eine gewisse Sonderstellung einzunehmen scheint und von den Konjugaten überhaupt bisher nur die fadenförmigen (bes. *Spirogyra*) Gegenstand ähnlicher Untersuchungen waren, möge die Veröffentlichung rechtfertigen. Es zeigt sich auch, daß die großen, jedem Eingriff und Einblick leicht zugänglichen Zellen der Desmidiales bessere Beobachtungsobjekte abgeben als die Fadenkonjugaten oder die im Zellverbande steckenden, oft viel kleineren Zellen der höheren Pflanzen. Als ein besonders günstiger Umstand bei der Verwendung dieser Familie wird in mehreren Arbeiten der letzten Zeit aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien hervorgehoben, daß es bei dieser Algengruppe möglich ist, auf einem Objektträger größere Teile einer ganzen Biocönose zu untersuchen und so das oft überraschend verschiedene Verhalten der einzelnen Arten und Entwicklungszustände gegen Reagenzien (Vitalfarbstoffe etc.) festzustellen (Cholnoky u. Höfler, Höfler u. Schindler, Hirn u. a.).

Meine Beobachtungen erstreckten sich außer auf *Netrium digitus (N. d.)* zu Kontrollzwecken auch auf die Desmidiale *Closterium lunula* Müller (Nitzsch),

welche sich ebenfalls durch besonders große Zellen auszeichnet. Die Algen letzterer Art stammten aus einem Hochmoore bei Karlsstift (N.-Österr.) und waren längere Zeit im Wiener Pflanzenphysiologischen Institut im Originalwasser in tadellosem Zustande weiter kultiviert worden.

Die verwendeten Proben von *N. d.* waren in drei verschiedenen Partien am 15. April, 20. Mai und 20. Oktober 1953 aus der „Tintenlacke", einem Teile des Hochmoores „Rotmoos" am Lunzer Obersee (N.-Österr.), gesammelt worden. Die Tintenlacke, deren pH nach den Untersuchungen mehrerer Beobachter etwa zwischen 4,5 und 5,2 schwankt, enthält in der Randzone in den *Sphagnum*-Rasen (meist *Sphagnum magellanicum)* ungeheure Mengen von *N. d.* in dominierender Weise gegenüber relativ wenigen anderen Arten von Desmidiales. Die gesammelten Proben wurden mit mindestens je einem Liter des Standortswassers in schonender Weise nach Wien gebracht, hier in weithalsige Fläschchen von 100 cm^3 Inhalt verteilt und in diesen Portionen zu Versuchen verwendet. Der im Laufe der Zeit eingetretene Verdunstungsverlust wurde nach Bedarf durch vorsichtigen Zusatz einer Abkochung von Sphagnummoos in dest. Wasser ersetzt. Diese Nährflüssigkeit hatte sich dem Verfasser bei der Weiterkultur von *N. d.* stets gut bewährt. So behandelte *Netrium*-Einsammlungen halten sich, wenn nicht besondere Zwischenfälle eintreten (Überhitzung, Parasitenbefall), über ein Jahr und zeigen meist reichliche Teilungsstadien, vorausgesetzt, daß die ursprünglich mitgenommene Menge des Standortswassers nicht zu gering war. Der größere Teil der so aufgeteilten Proben wurde in einem Kühlbecken des Pflanzenphysiologischen Instituts gehalten, wobei das durchströmende Leitungswasser in der wärmeren Jahreszeit zwischen 7 und 10° C aufwies. Ein anderer Teil wurde in der Wohnung, tagsüber bei Zimmertemperatur, nachts bei der Temperatur der Gasse gehalten, mit Ende des Herbstes jedoch dauernd im ungeheizten Zimmer. Sonnenbestrahlung wurde bei den Algen im Kühlbecken etwa 2—3 Stunden täglich zugelassen, bei den übrigen gänzlich vermieden. Bei keiner der beiden Gruppen, die man natürlich nicht als „Reinkultur" bezeichnen dürfte, fand sich während der ganzen, etwa sechs Monate dauernden Beobachtungszeit irgendein Unterschied der allgemeinen Vitalität, der Protoplasmabewegung etc. In den dem Lichte ausgesetzten Proben waren auch fast immer Teilungsstadien zu finden.

Die vollständige Verdunklung einzelner Proben wurde in der Weise durchgeführt, daß einige der im Kühlbecken gehaltenen Gläschen in geräumige Zinkblechschachteln, die im Zimmer zu verdunkelnden Proben in dichte Kartonschachteln gestellt wurden, wobei sorgsam darauf geachtet wurde, daß die verdunkelten Proben dieselben Temperaturverhältnisse durchmachen mußten wie die im Licht stehenden Kontrollen. Im ganzen wurden so etwa 20 Proben von *N. d.* und *Closterium lunula* einer Verdunklung von bestimmt aufgezeichneter Zeitdauer ausgesetzt und in bestimmten Zeitintervallen untersucht. Ein ungünstiges Moment für die Beurteilung des Verdunklungseffektes bildete der Umstand, daß in keiner Partie des Ausgangsmaterials die Zellen sich in bezug auf die Menge der Reservestoffe (Stärke, Öl) ganz gleich verhielten. Von den im ersten Frühjahr und Spätherbst gesammelten Proben zeigten etwa 50% der Algen so reichliche Ansammlungen von Pyrenoidstärke, daß das Pyrenoid vollständig in einem dichten Mantel von Stärkekörnchen verborgen war. Reichliche Öltropfen waren vorhanden, einige dieser Zellen hatten gelben oder rötlichgelben Zellsaft und etwas gelblich gefärbte Chloroplasten. Letztere waren im übrigen morphologisch nicht verändert, auch das Plasma zeigte deutliche, oft sehr lebhafte Plasmaströmung. Diese Zellen befanden sich also in einem Zustande, den man mit Czurda als beginnende „Speicherdegeneration" bezeichnen könnte. Es handelte sich hier um

die Winterform von *N. d.* Sie entsteht, wenn der Mineralsalzgehalt des Standortswassers bei noch oder bereits wieder vorhandener Assimilationstätigkeit abnimmt. Die gegen den Herbst zunehmende Zahl dieser Zellen ist daher wahrscheinlich mit einem Herabgehen der pH-Zahl des Standortswassers zu erklären, da im Sommer und Herbst Regenwasser den einzigen Zufluß zum Moore bildet. Mit Beginn des Winters wird allerdings auch die Assimilation infolge des eintretenden Lichtmangels (Schneebedeckung) stark eingeschränkt sein. Im Frühjahr kommen mit dem schmelzenden Schnee offenbar wieder größere Mengen von anorganischen und organischen Substanzen ins Moor, die eine Erhöhung des pH zur Folge haben dürften. Mindestens ein Teil der Winterformen, soweit er überlebte, dürfte dann, bei zugleich zunehmender Assimilationstätigkeit, wieder in die lebhaft grüne, durch rasche Teilungen vermehrte Normalform der Alge sich verwandeln. Es wäre naheliegend, anzunehmen, daß die Entstehung der „Sommergeneration" von *N. d.* durch Auskeimen von Zygosporen verursacht wird und alle Winterformen zugrunde gingen. Aber es wird nicht nur in der Literatur immer wieder betont, wie selten Zygosporen von *N. d.* gefunden wurden, auch der Verfasser selbst hat während einer fast zwanzigjährigen Beobachtungszeit zu allen Jahreszeiten (mit Ausnahme der Zeit, wo das Moor unter Schneebedeckung lag) niemals auch nur eine einzige Zygospore von *N. d.* finden können. Ebensowenig konnten *Netrium*-Zellen im Vorstadium der Kopulation oder nach derselben beobachtet werden. Einzelne Exemplare der Alge mit so reichlicher Stärkeansammlung fanden sich übrigens dauernd auch im Sommermaterial. Wie bereits erwähnt, mußte infolge des inhomogenen Frühjahrs- und besonders Herbstmaterials der Effekt der Lichtentziehung in bezug auf die Zeit sehr vorsichtig eingeschätzt werden. Besonders interessant war, daß die im Spätherbst gesammelten Algen gegen die Verdunklung zum Teil (etwa 60%) ganz unempfindlich waren, das heißt gar nicht oder sehr langsam auf die Verdunklung reagierten. Es trat weder eine Abnahme der Reservesubstanzen noch eine zunehmende Atrophie der Chloroplasten ein. Die Protoplasmaströmung dieser Algen war trotzdem recht lebhaft, sie waren keineswegs abgestorben. Ähnlich wie *N. d.* verhielt sich in meinen Versuchen auch *Closterium lunula*. Wollte man daher solche Verdunklungsversuche in besonders exakter Weise durchführen, so würden, da ein vollständig homogenes Material wohl in keinem natürlichen Standorte zu finden ist, eventuell Algenreinkulturen zu diesem Zwecke zu versuchen sein. Sie dürften zwar eine homogenere Beschaffenheit aufweisen, aber von anderen Fehlerquellen nicht frei sein.

Vor der Mitteilung des Effektes der Verdunklungsversuche müssen einige Eigentümlichkeiten des Zellbaues von *N. d.* angeführt werden. Unter den Mesotäniaceen, der ersten Familie der Desmidiales, zeigt *N. d.* weitaus die größten Zellen. Die Exemplare meiner Aufsammlung hatten einen Längsdurchmesser von durchschnittlich 260 μ, einen Querdurchmesser von 60 μ, wobei die Zellenlängen beträchtlich schwankten, die Querdurchmesser kaum wesentlich verschieden waren. Möglicherweise sind in der Tintenlacke neben der Normalform auch kleinere Rassen von *N. d.* vorhanden, von welchen ich die Varietät *latum* Hustedt am wahrscheinlichsten halten würde. Da jedoch einerseits alle *N.*-Zellen vor und nach der Teilung sehr beträchtliche Längendifferenzen aufweisen, anderseits im Verhalten längerer oder kürzerer Zellen bei meinen Versuchen kein Unterschied wahrnehmbar wurde, kommt dieser Frage keine besondere Bedeutung zu. *N. d.* hat unter allen Desmidiales wahrscheinlich die dünnste Zellhaut, welche die typische, von Lütkemüller bereits 1902 festgestellte Zweischichtigkeit zeigt. Die um die Zelle herum

ausgeschiedene Gallerthülle ist manchmal recht beträchtlich, ein Porenapparat in der Zellwand konnte aber nicht nachgewiesen werden. Besondere Eigentümlichkeiten, die bisher noch bei keiner anderen Desmidiale gefunden wurden, zeigt die Anordnung des Protoplasmas in der Zelle (Kopetzky-Rechtperg). Während Kern und Chloroplast wie bei den anderen Konjugaten mit Protoplasmaschichten überzogen sind, die meist lebhafte Strömung zeigen, besteht der Protoplasmabelag an der Innenwand der Zelle hier deutlich aus einer äußeren unbeweglichen, mehr grobkörnigen Schicht und aus einer inneren hyalinen, beweglichen Cytoplasmalage. Für *N. d.* ist es nun im Gegensatz zu anderen Konjugaten charakteristisch, daß diese äußere Cytoplasmaschicht zarte strangförmige Verdickungen zeigt, welche in Abständen von ungefähr 3 μ parallel zur Längsachse der Zelle an der Innenseite der Zellwand der ganzen Länge derselben nach bis in die Nähe der Zellpole verlaufen. Manchmal sind die Abstände nicht ganz gleich, es finden sich auch einzelne fadenförmige, schief zwischen den longitudinalen Strängen ziehende Verbindungen. Die Zahl der längsverlaufenden Stränge beträgt (bei einem Abstande von ca. 3 μ) etwa 37—40 im ganzen Umkreis der Zelle. Dadurch, daß diese Cytoplasmastränge, welche natürlich nur bei starker Vergrößerung sichtbar sind, etwas in das Innere der Zelle hineinragen, entstehen zwischen ihnen gewissermaßen Rinnen, in denen wie in einem Bachbette das bewegliche Cytoplasma zirkuliert. Die Intensität dieser Strömung ist auch bei *N. d.* besonders von der Temperatur, nicht von den Beleuchtungsverhältnissen abhängig. Dieser Cytoplasmaanteil ist an sich hyalin, dünnflüssig. Er enthält in mehr oder minder großer Anzahl tröpfchenförmige Einschlüsse von etwa ½ bis 1 μ Durchmesser, die in der Strömung mitgeschleppt werden, jedoch auch teilweise Brownsche Molekularbewegung zeigen. Diese Körperchen sind etwas stärker lichtbrechend als das umgebende Cytoplasma, ihre Konsistenz ist dichter als dasselbe. Sie zeigen, wenn sie aneinander vorbeigleiten, manchmal eine vorübergehende Deformation. Bei Zerstörung der Zelle verquellen sie äußerst rasch im Wasser. Eine Beschreibung dieser Einschlüsse konnte ich in der Literatur über die Konjugaten bisher nicht finden. Sie verhalten sich gegenüber Fixierungsmitteln und Farbstoffen genau so wie die als „Chondriosomen (Mitochondrien)" bezeichneten Plasmaeinschlüsse (Fixierung durch chromsäure- oder formalinhaltige Mischungen; z. B. nach Régaud Vitalfärbung mit Janusgrün, Färbung mit Hämatoxylin etc.). Wenn ich daher in folgendem die Körperchen als „Chondriosomen" bezeichne, so möchte ich es trotzdem dahingestellt sein lassen, welcher Natur sie eigentlich sind, da in der botanischen Literatur im Laufe der Zeit offenbar die verschiedenartigsten Plasmaeinschlüsse „Chondriosomen" benannt wurden. Vielleicht wäre hier der von A. Meyer für ähnliche Einschlüsse gebrauchte Ausdruck „Allinante" zutreffender. Wie bei *N. d.* finden sich die gleichen Körperchen übrigens auch bei zahlreichen anderen Desmidiales, so besonders in großer Zahl, aber etwas geringerer Größe bei *Closterium lunula*. Gipskristalle, welche bei letzterer Desmidiacee auch in Cytoplasma schwimmend nachgewiesen werden können, waren bei *N. d.* dortselbst nicht zu finden, sondern nur im Vakuolenraume.

Der Kern von *N. d.* hat die Form eines Rotationsellipsoides, das mit seiner kürzeren Achse von ca. 6—10 μ in der Längsrichtung der Zelle genau zentral liegt, während die längere Achse (von ca. 20 μ) die Richtung des Querdurchmessers der Zelle hat. Der Kern enthält ein einziges Kernkörperchen und ist wie bei allen Desmidiales von einer Cytoplasmahülle, der Kerntasche, umgeben. In normalen Zellen bedecken die Enden der beiden Chloroplasten den Kern in der Mitte der Zelle so, daß er kaum sichtbar ist.

Die Vakuolenräume von *N. d.* sind, wie am besten an Querschnitten fixierter Zellen erkannt wird, ziemlich groß — sie finden sich nicht nur in Form einer um den Kern herum liegenden Vakuole, sondern auch der ganzen Länge der Zelle nach zwischen den Fortsätzen der Chloroplasten als langgestreckte Räume und an beiden Zellpolen. Alle diese Räume stehen, im Gegensatz zu den Vakuolen anderer Desmidiales, miteinander in Verbindung. Die bereits erwähnten Gipskristalle, welche stets in mehr oder minder großer Zahl in den Vakuolen gefunden werden, haben bei *N. d.* die Form langgestreckter monokliner Tafeln, fast säulenförmig, meist von geringer Größe, bis etwa 3,6 μ Länge. Sie bewegen sich im Zellsafte der Schwere folgend, die kleineren unter ihnen zeigen auch Brownsche M.B. Außer den Kristallen finden sich im Zellsafte älterer Zellen, besonders der Winterformen, häufig kugelige oder knollige Abscheidungen, deren Oberfläche meist maulbeerartig gebuckelt ist. Sie sind oft zu größeren Konglomeraten zusammengebacken und liegen immer ganz unbeweglich eingeklemmt in den Vakuolenräumen zwischen den Rippen der Chloroplasten. Sie verquellen beim Zerdrücken einer Zelle im Wasser sehr rasch von innen heraus, wobei die äußeren Schichten meist ein schwarzbraunes krümeliges Pigment hinterlassen, das oft mit Salzsäure Blaufärbung zeigt (Karotin). Diese Körperchen verhalten sich im übrigen so, wie die bei vielen Desmidiales regelmäßig vorkommenden, vom Verfasser genauer untersuchten „Gallert- oder Zersetzungskörperchen" (Kopetzky-Rechtperg). Sie unterscheiden sich von denselben aber immer durch ihre vollständige Unbeweglichkeit, während die Gallert-Körperchen, regelmäßig frei im Vakuolenraum schwimmend, stets lebhafte Brownsche M.B. zeigen. Hier liegt wieder ein Beispiel dafür vor, daß bei den Desmidiales selbst das Aussehen identischer oder fast identischer Zelleinschlüsse von Art zu Art recht verschieden sein kann. Ebenfalls unbeweglich, in die Vakuolen hineinragend, sind die aus dem Chloroplasten ausgeschiedenen Öltropfen. Über die Chloroplasten selbst, deren Veränderungen bei Lichtabschluß beobachtet werden sollten, ist zu bemerken: *N. d.* hat in jeder Zellhälfte einen einzigen, um das stabförmige Pyrenoid herum gelagerten großen axialen Chlorophyllkörper, von welchem, quer aufgesetzt gegen die Zellperipherie zu, 9 Rippen wie die Speichen eines Rades abzweigen. Die in allen Handbüchern angegebene Zahl von 6 oder 7 Rippen ist unzutreffend, wie man an Querschnitten sehen kann. An den Zellpolen laufen diese Rippen in zungenförmige schmale Fortsätze aus, welche korbartig die Vakuole umgreifen. In der Mitte der Zelle berühren sich beide Plastiden über dem Zellkern. Jede der Chloroplastenrippen ist wieder gegen die Peripherie der Zelle zu ihrer ganzen Länge nach in lappige Fortsätze zerschnitten, die einen schmalen Stiel und einen breiten, ankerförmig aussehenden Endfortsatz haben. An jeder Rippe finden sich in der Halbzelle ungefähr 9 bis 10 solcher Lappen. Sie sind an ihrer Basis abwechselnd nach rechts und links abgebogen, so daß sie mit der Rippe etwa das Aussehen eines Sägeblattes bieten, dessen Zähne nach zwei verschiedenen Seiten ausgebogen wären. Von der Peripherie dieser Ankerfortsätze an beiden Ecken derselben gehen Protoplasmafäden zu dem oben beschriebenen unbeweglichen Cytoplasmawandbelag der Zelle und befestigen so den Plastiden an der Zellwand. Dieses Verhältnis ist bei normalen Zellen freilich nicht ohne weiteres sichtbar, da die Chloroplastenlappen sich der Zellwand sehr enge anlegen. Über den feineren Aufbau der Chloroplasten von *N. d.* wäre zu bemerken, daß sich an denselben bei entsprechender Vergrößerung und Beleuchtung sehr deutlich die sogenannte „Granastruktur" erkennen läßt. In ihrer Anordnung entsprechen die Granaplättchen bei *N. d.* den von Geitler bei *Closterium* beschriebenen Formen, d. h. sie stellen sich in der Flächenansicht

der Chloroplastenfortsätze als dicht nebeneinander liegende Plättchen, in der darauf senkrechten Richtung als feine Striche dar. Nach neueren Untersuchungen von Mevius und Düvel dürften manchmal die Granaplättchen in den einzelnen Schichten so gegeneinander verschoben sein, daß in einer Richtung eine dunkle Fläche statt einem Mosaik von Plättchen sichtbar ist. Auch bei *N. d.* konnte ich einigemal derartiges beobachten.

Über die nun folgende zusammenfassende Darstellung des Effekts aller Verdunklungsbefunde wird bemerkt, daß überall, wo über die Verdunklungswirkung bestimmte Zeitangaben gemacht werden, nur das im Frühsommer (20. Mai) gesammelte Material berücksichtigt wurde, weil nur dieses in einem größtenteils homogenen, in bezug auf die Menge der vorhandenen Reservesubstanzen gleichartigen Zustande waren. Die Wirkung des vollständigen Lichtausfalles scheint bei *N. d.* und *Closterium lunula* innerhalb der ersten 8 Tage der Verdunklung lediglich in einem mehr oder minder vollständigen Abbau der Reservesubstanzen (Stärke, Öl) zu bestehen, wobei die Stromastärke etwas rascher verschwindet als die Pyrenoidstärke, von welch letzterer überhaupt noch längere Zeit (bis zu 2 Wochen) kleinere schuppenförmige Reste zurückblieben. Wenn Öltropfen vorhanden sind, so werden sie noch langsamer als die Stärke abgebaut. Der Schwund der Stärke bewirkt zuerst, daß die Chloroplasten klarer und durchsichtiger werden. Eine stärkere Vergrünung derselben tritt bei vollständigem Lichtabschluß nicht ein. Bei Algen, welche teils im natürlichen Standorte, teils in einer Kultur unterbelichtet werden, ist ja bekanntlich eine solche immer wahrzunehmen. In unserem Falle aber sieht man die Chloroplasten allmählich mehr und mehr verblassen, wobei oft ein deutlicher gelber Farbton auffällt. Nach dem also zunächst einsetzenden Schwund der Reservestoffe besteht als weitere Folge des Lichtentzuges die vom Ende der ersten Woche an beginnende, dauernd fortschreitende Atrophie, resp. Verkleinerung der Chloroplasten als hauptsächlichstes und wesentlichstes Symptom. Die ersten Zeichen derselben werden an der Peripherie der ankerförmigen Ausläufer der Rippenfortsätze sichtbar, indem sich dieselben ein wenig von der Zellinnenwand, der sie angelegt waren, zurückziehen.

Dabei wird es erst deutlich, daß von jedem Endzipfel dieser Fortsätze ein Protoplasmafaden gegen die Innenwand der Zelle hinzieht und den Chloroplasten mit den oben beschriebenen, unbeweglichen Protoplasmalängszügen der Zellwand verbindet Abbildung (Abb. 1 *d*). Erst im Verlaufe der Verdunklung in der zweiten Woche zeigt sich die fortschreitende Atrophie in weiteren ganz charakteristischen Veränderungen der „Ankerfortsätze". Die Kerben zwischen den beiden Lappen derselben gleichen sich aus, die Ankerbasis wird schmäler. Der Stiel der Anker verlängert sich (Abb. 1 *e* u. *f.*), so daß man den Eindruck hat, es bestehe eine Zugwirkung auf diese Fortsätze vom Zentrum des Chloroplasten her. Allmählich verschmelzen die beiden Endlappen der Ankerfortsätze zu einem einzigen, der nur mehr durch einen Protoplasmafaden mit der Zellwand in Verbindung steht. Vom Ende der ersten Woche an sieht man auch eine vorerst mäßige Retraktion des Chloroplasten an den Polseiten der Zelle und in der Mitte derselben, so daß der Kern und das ihn umgebende Cytoplasma sichtbar wird. Überall schei-

nen die zu Zipfeln und Zacken ausgezogenen Fortsätze des Chloroplasten nunmehr verkürzt und abgerundet. Es scheint, daß mit dem Abbau der Plastidensubstanz durch Atrophie zugleich die Kräfte der Kohäsion mehr und mehr formgebend an dem Chloroplasten wirksam werden, so daß er, entsprechend seiner halbflüssigen Konsistenz, eine längliche Tropfenfigur annimmt. Dieser Vorgang hat große Ähnlichkeit mit der von Eibl beschriebenen Retraktion des Chloroplasten der Desmidiacee *Micrasterias*, wenn die Zellen durch Klopfreize beeinflußt werden (Eibl hat übrigens

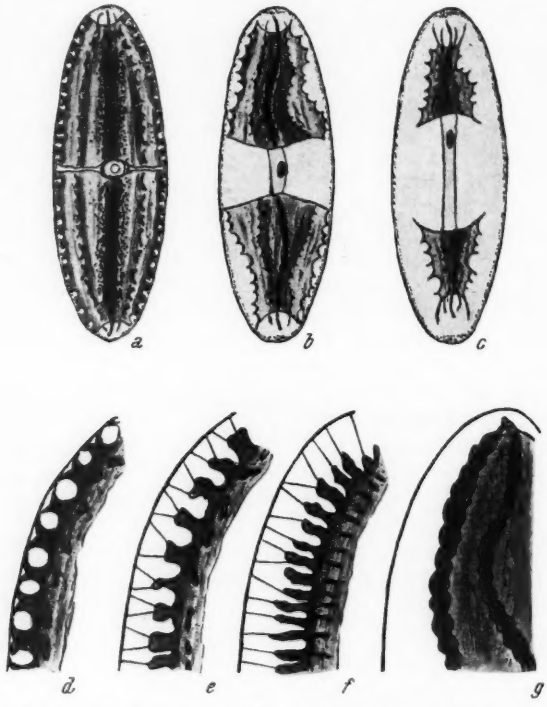


Abb. 1. *a c Netrium digitus*, ganze Zellen; *a* Normalzustand, *b* nach dreiwöchiger, *c* nach etwa fünfwöchiger Verdunklung. *d e* Randteile der Chloroplastenrippen; *d* Normalzustand, *e* nach 2 Wochen, *f* nach 3 Wochen, *g* nach 4 bis 5 Wochen Verdunklung.

auch bei *Netrium* selbst durch Klopfreize eine ähnliche Reaktion des Plastiden erzeugen können). Es handelt sich aber, wie Eibl auch für seinen Fall hervorhebt, weder bei den Klopfreizeffekten noch bei der Plastidenretraktion durch Hungeratrophie um eine aktive, selbständige Retraktion der Chloroplasten. Im Falle der Hungeratrophie von *Netrium* wird der periphere Teil des Plastiden abgebaut und offenbar zugleich, ebenfalls durch atrophische Schädigung des Cytoplasmas, die Befestigung des Pla-

stiden an der Zellwand insuffizient. Bei Eibls Klopfversuchen wird dieses Cytoplasma gereizt und zur Kontraktion gebracht, und da es in Form von Platten und Zungen den Chloroplasten einschließt, auch dieser zum Rückzug gebracht — sekundär werden dann in beiden Fällen die abrundenden Kohäsionskräfte des Plastiden wirksam. Das nächste Stadium der Atrophie, welches etwa von Beginn der dritten Woche an zu beobachten ist, besteht in einer ziemlich rasch, vielleicht sogar plötzlich einsetzenden Ablösung aller bereits gerundeten Ankerfortsätze von der Zellinnenwand durch Zerreißung der Cytoplasmafäden, die bisher die Verbindung hergestellt hatten. Dann zieht sich die ganze Chloroplastenmasse noch weiter zurück und ihr Gesamtvolumen verringert sich noch mehr (Abb. 1 *g*). In diesem Stadium sieht man auch, daß die Chloroplastenrippen entsprechend der Verkürzung der Chloroplasten in der Längsachse nicht mehr in einer Geraden, sondern in Bogenlinien von den Plastiden abzweigen, was darauf schließen läßt, daß die Plastiden nicht nach allen Richtungen gleichmäßig schrumpfen. Nicht so schnell geht der Ablösungsprozeß der Chloroplasten in der Zellmitte vonstatten. Die beiden schrumpfenden Plastiden ziehen nach entgegengesetzter Richtung den Kern wie ein Band auseinander, so daß seine Breite schließlich nur wenige Mikromillimeter beträgt. Sogar das Kernkörperchen wird zugleich in die Länge gezogen und nimmt schmal-elliptische Form an (Abb. 1 *c*). Den Beginn einer solchen Atrophie bei *Zygnema peliosporum* hat Czurda (1937, S. 65) abgebildet, doch in einem viel jüngeren Stadium. Seine Angabe: „Die Plastiden vermögen sich aktiv, infolge einer Längskontraktion von der Wand unter Fadenziehen des Cytoplasmas, ins Zellinnere zurückzuziehen", läßt natürlich die Frage offen, was unter dem Ausdrucke „aktiv" zu verstehen sei. Eine Arbeit, die sich vermutlich mit ähnlichen Verhältnissen bei *Spirogyra* befaßt (Sakamura), war mir leider nicht zugänglich. Die geschilderten Erscheinungen an den Plastiden und am Cytoplasma leiten in der dritten Woche der Verdunklung das vollständige Absterben der Zellen ein. Dieses Ereignis tritt natürlich je nach der Menge der vorhandenen Reservestoffe etwas früher oder später ein. Während bis zu dieser Zeit der Chloroplast grüngelblich gefärbt war, nimmt er nun eine olivbraune Färbung an. Seine Konsistenz nimmt beträchtlich zu, wie beim Zerdrücken einer Zelle festgestellt werden kann. Das Pyrenoid verliert vollständig seine Färbbarkeit, der ganze Chloroplast ist auf etwa die Hälfte verkleinert. Im Cytoplasma sind die „Chondriosomen" vollständig verschwunden, ebenso die streifenförmige Anordnung des wandständigen Cytoplasmas. Dieses ist manchmal geballt an irgendeiner Stelle der Zellinnenwand angehäuft, während der ganze Innenraum der Zelle mit Flüssigkeit gefüllt ist, in welcher kleinste Mikrosomen in Brownscher M. B. schwimmen (Abb. 1 *c*). Solche Zellen werden fast sämtlich von Pilzen überfallen und in kurzer Zeit bis auf die Zellhaut zerstört. Eine Abnahme der Gallertproduktion vom Beginne der Verdunklung an konnte zwar nicht nachgewiesen werden, ist aber wahrscheinlich, da ich in verdunkelten Proben nicht mehr beobachten konnte, daß die Zellen sich in einer Gallertmasse anhäuften. Bemerkenswert scheint zu sein, daß die „Granastruktur" der Chloroplasten in den ersten zwei Wochen der Verdunklung noch besser

zu sehen war als bei nicht verdunkelten Zellen — wahrscheinlich wegen des Verlustes der Stromastärke. Diese Struktur wurde besonders auf Zusatz von Jod-Jod-Kali-Lösung deutlicher. In späteren Stadien der Atrophie verschwand sie gleichfalls.

Die Frage, in welchem Zeitpunkte der Verdunklungsatrophie die Zellen bei neuerlicher Beleuchtung wieder in normalen Zustand gelangen konnten, läßt sich natürlich nicht ganz präzise beantworten, da das Tempo der Atrophie ja von der Menge der vorhandenen Reservestoffe abhängig ist und diese wieder infolge der Inhomogenität jedes Materials aus einem natürlichen Standorte immer ungleich ist. Im allgemeinen konnte ich jedoch feststellen, daß bei dem stärkearmen, recht gleichmäßigen Material der Frühsommeraufsammlung die Mitte oder das Ende der zweiten Verdunklungswoche den letzten Termin darstellten, nach welchem bei Absetzung der Verdunklung die eingetretenen Atrophieerscheinungen noch reversibel waren. Es scheint, daß das Abreißen der Protoplasmaverbindungen vom Wandcytoplasma den kritischen Moment darstellt, nach welchem die Zelle sich nicht wieder zum normalen Zustande erholen kann. In mehrfachen Versuchen konnte ich konstatieren, daß verdunkelte, am zehnten Tage wieder ans Licht gebrachte Netrien in bezug auf die Gestalt der Chloroplasten nach einer Woche der Wiederbeleuchtung sich vollständig erholt hatten. Ähnlich verliefen auch Versuche selbst nach zwölftägiger Verdunklung. Was die zum Vergleiche mitverdunkelten Zellen von *Closterium lunula* anbelangt, so ist zu berichten, daß die Atrophie ihrer Chloroplaste ähnliche Bilder ergab wie bei *N. d.* Aber die Verdunklungsatrophie ging etwas langsamer vor sich, da der Chloroplast im ganzen viel voluminöser ist als bei *N. d.* und meist sehr große Stärkemengen enthält, auch das Vakuom nicht so umfangreich entwickelt ist wie bei *N. d.*

Trotzdem erfolgte die Abhebung der Rippenfortsätze von der Zellinnenwand etwas früher als bei *N. d.* Die in lebhafter Bewegung begriffene Plasmaschichte an der inneren Zellwand ist dicker als bei *N. d.*, von einer unbeweglichen, nach außen von dieser liegenden Cytoplasmalage ist nichts zu sehen. Die Fortsätze der Chloroplastenrippen sind nicht ankerförmig, zweigespalten wie bei *N. d.*, sondern stellen kurze Zipfel dar, die vermutlich irgendwie mit der Zellwand durch Cytoplasmafäden in Verbindung stehen, ohne daß man jedoch eine Art Anhängeapparat nachweisen könnte. Die Endstadien bei Verdunklung verliefen wie bei *N. d.*

Zusammenfassung

Bei Versuchen, die Wirkung der Lichtentziehung auf die Alge *Netrium digitus* zu prüfen, wurde konstatiert: Der auffälligste Effekt der Verdunklung besteht in einer nach der ersten Woche einsetzenden Atrophie der Chloroplasten, die sich in charakteristischer Weise verkleinern (Abb. 1). Die Lichtentziehung wird von reservestoffarmen Zellen nicht viel über zwei Wochen ertragen, ihre Folgen sind nach einer Verdunklung von etwa 10—12 Tagen reversibel, wenn die Algen wieder ans Licht gebracht werden. Im Spätherbst reagieren die mit Reservestoffen stark versehenen

Zellen überhaupt kaum mehr auf die Verdunklung („Winterform von *Netrium*"). Wie der Chloroplast unterliegt auch das Cytoplasma einer Atrophie, bei welcher besonders die Abnahme der „Chondriosomen" bemerkenswert ist.

Der Autor erlaubt sich, Herrn Professor Dr. K. Höfler, Vorstand des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Wien, für die bei dieser Arbeit geleistete Unterstützung herzlichsten Dank zu sagen. Herrn Professor Dr. F. Ruttner, Vorstand der Hydrobiologischen Station in Lunz am See, der mir, wie seit vielen Jahren, bei der Beschaffung des Algenmaterials seinen Beistand geleistet hat, gebührt ebenfalls mein besonderer Dank. Für die sorgsame Mithilfe bei der Herstellung der Zeichnungen habe ich Herrn Dr. O. Kiermayer zu danken.

Literatur

Cholnoky, B. v., und K. Höfler, 1950: Vergleichende Vitalfärbungs-Versuche bei Hochmooralgen. S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, *159*, 6—10.

Czurda, V., 1937: Handbuch der Pflanzenanatomie von Linsbauer *6*.

Eibl, K., 1939: Kontraktion der Chromatophoren bei *Micrasterias rotata*. Protoplasma *32*.

— 1939: Studien über das Plasmolyseverhalten der Desmidiaceen-Chromatophoren. Protoplasma *33*.

— 1941: Die Restitution der Chromatophorenform bei *Micrasterias rotata*. Protoplasma *35*.

Geitler, L., 1937: Über den Granabau der Plastiden. Planta *26*.

Hirn, I., 1953: Vitalfärbungsstudien an Desmidiaceen. Flora *140*.

Höfler, K., und H. Schindler, 1951: Vitalfärbung von Algenzellen. Protoplasma *40*.

— — 1952: Algengallerten im Vitalfärbungs-Verfahren. Öst. bot. Ztg. *99*.

— — 1953: Vitalfärbbarkeit verschiedener Closterien. Protoplasma *42*.

Kopetzky-Rechtperg, O., 1931: Die „Zersetzungskörperchen" der Desmidiaceenzelle. Arch. Protistenk. *75*.

— 1938: Über eine Protoplasmastruktur der Desmidiale *Netrium digitus*. Protoplasma *31*.

Mevius, W., und D. Düvel, 1953: Die Granaanordnung der Chloroplasten. Protoplasma *42*.

Sakamura, T., 1933: Beiträge zur Protoplasmaforschung an *Spirogyra*-Zellen. J. Sc. Hokkaido Imp. Univ. Sapporo. Ser. 3. 2.

Some Features of *Nitella* Chloroplasts as Revealed by the Electron Microscope

By

O. L. Sponsler[1] **and Jean D. Bath**[2]

Department of Botany

University of California, Los Angeles

With 4 Figures

(Received June 14, 1954)

With the advent of the electron microscope it has become possible to obtain a closer view of the structure and division of the chloroplasts of *Nitella* than was afforded with the ordinary light microscope.

I. Material and Method

The internodal cells of *Nitella,* a green alga of the *Characeae* or Stoneworts, have long served cell physiologists as classic material for study. Such cells are often several centimeters or more in length and a millimeter or so in diameter. The internodal cells are highly vacuolated with a thin layer of peripheral cytoplasm in which chloroplasts are embedded. In the technique used here the internodal cell was cut, and the cell contents extruded as a droplet onto a parlodion-coated electron microscope screen. This droplet was diluted with distilled water, and the suspension was allowed to stand in contact with the screen for a few minutes, then the remainder of the droplet was removed. The preparation was dried in vacuo and studied with an R. C. A. Electron Microscope, Type E. M. U.[3]

II. Observations

Along with various kinds of cytoplasmic particles of all sizes (Sponsler and Bath 1953) many chloroplasts may be observed in the prepara-

[1] Deceased, March 14, 1953.

[2] Also of the Department of Biophysics, Division of Cell Biophysics, School of Medicine.

[3] We are indebted to the College of Engineering for the use of this instrument and to Mr. Henry Froula for its maintenance.

tions. In general the largest of the individual chloroplasts when viewed in the vacuum-dried state, as they are in the electron microscope, are 3–4 microns in diameter.

Mature chloroplasts were perhaps first observed to undergo division as early as 1846 by Nägeli (Guilliermond 1933), and such division has been

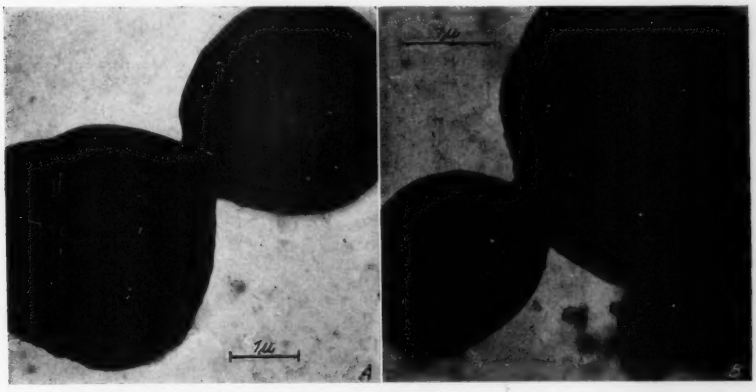


Fig. 1 a, b. Chloroplast fission.

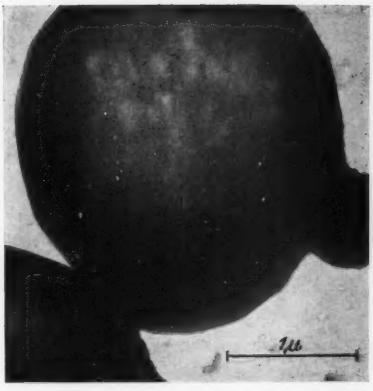


Fig. 2. Protuberance from one of daughter plastids.

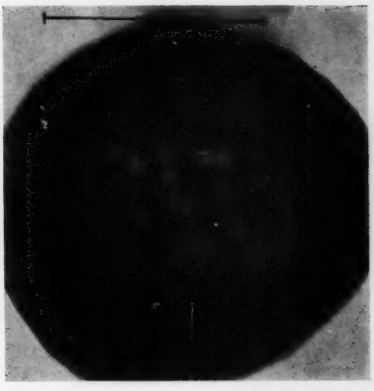


Fig. 3. Single plastid showing spongy-like interior.

observed microscopically by many other workers since then (Granick 1949, Stone 1932). The gentle technique of sample preparation described here has the advantage of preserving the dividing pairs perhaps somewhat better than the usual methods of chloroplast isolation; hence various stages of chloroplast reproduction may be observed.

Fig. 1 a shows in somewhat more detail than the light microscope affords two daughter chloroplasts presumably in the last stage of fission. Fig. 1 b shows two daughter plastids of quite unequal size. The smaller is about 1.8 μ; the larger about 3 μ in diameter.

Occasionally strange protuberances are observed jutting out from the plastid. Fig. 2 shows such a structure protruding from a plastid still adhering to the other daughter plastid. The protuberance is 0.7 μ across. The significance of this observation is not too clear at present.

Studies of chloroplast structure by this method leave much to be desired. One reaches the general impression that much of the material in the plastid is concentrated in an outer cortical region and that the structure

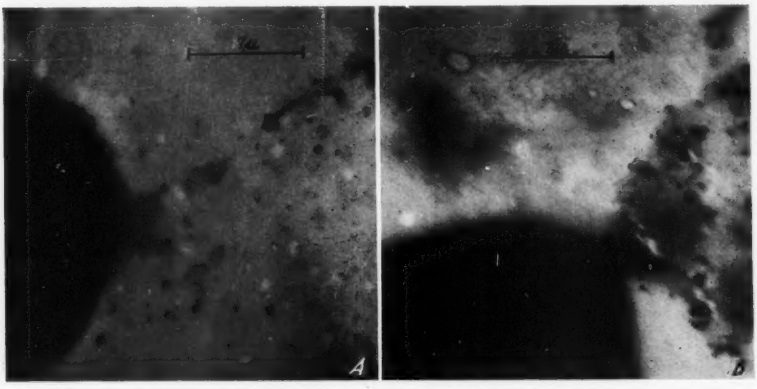


Fig. 4 a, b. Ruptured plastids showing small particles from interior.

has a somewhat spongy interior as shown in Fig. 3. Quite probably if these plastids were fixed in osmic acid, embedded in plastic and sectioned as other workers have done for other types of chloroplasts (Cohen and Bowler 1953, Wolken and Palade 1952), the outer region would be found to have a lamellar type of structure, probably essentially lipoprotein in nature (Frey-Wyssling 1948).

Typical internal grana of the type found in the higher plants are not believed to occur in the plastids of these algal forms, and none were observed by us (Steinmann 1952, Wolken and Palade 1952). In a few instances plastids were observed which had burst or ruptured for some cause. The extruded contents often contained minute particles of around 500 Å in diameter as shown in Fig. 4 a, b.

III. Summary

Nitella chloroplasts when extruded from the large internodal cells and examined with the electron microscope often show daughter plastids in various stages of division as well as occasional external plastid pro-

tuberances. In the individual plastids the main mass of the chloroplast material appears to be concentrated in the outer portion of the plastid leaving a somewhat spongy interior. The extruded contents of ruptured plastids often contain particles of around 300 Å in diameter.

Literature

Cohen, M., and E. Bowler: Protoplasma XLII, 414, 1953.
Frey-Wyssling, A.: Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives, New York, 1948.
Granick, S.: Photosynthesis in Plants. Ed. by James Franck and W. E. Loomis. Iowa State College Press, 1949.
Guilliermond, A.: The Cytoplasm of the Plant Cell. Mass., 1941.
Sponsler, O. L., and Jean D. Bath: Protoplasma XLII *69*, 1953.
Steinmann, E.: Exp. Cell. Res. *3*, 367, 1952.
Stone, Winona E.: Jour. Agr. Res. *45*, 421, 1932.
Weier, T. E., and C. R. Stocking: Bot. Rev. *18*, 14, 1952.
Wolken, J. J., and G. E. Palade: Nature, *170*, 114, 1952.

Vakuolenkontraktion bei vollen Zellsäften an Zwiebelzellen von *Tulipa silvestris* und *Colchicum speciosum*

Von

Wilhelm Scheidl

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 23. Dezember 1953)

Einleitung

Höfler (1947, 1949) unterscheidet in seinen Arbeiten über Vital- und Fluoreszenzfärbung an Epidermen von *Allium cepa* „volle" und „leere" Zellsäfte. Die „vollen" enthalten Speicherstoffe, welche basische Farbstoffe wie Neutralrot und Chrysoidin chemisch zu binden vermögen, während bei den „leeren", die frei von Speicherstoffen sind, im neutralen oder basischen Bereich Ionenfärbung auftritt. Bei *Allium cepa* zeigen die Außenepidermen in der Regel volle Zellsäfte, ohne daß bei Färbung Vakuolenkontraktion auftritt, während bei den leeren Zellsäften der Innenepidermis Allgemeinkontraktion in Erscheinung tritt. Es liegt nun der Schluß nahe, daß die Vakuolenkontraktion bei Färbung mit basischen Farbstoffen allgemein nur auf leere Zellsäfte beschränkt wäre. Daß dies jedoch nicht unbedingt der Fall sein muß, zeigen zwei neue Objekte: *Tulipa silvestris* L. und *Colchicum speciosum* Stephen. An der Innenepidermis des die Zwiebelknollen dieser Liliaceen umhüllenden ersten Laubblattes finden sich auffallende Idioblasten, die vordem noch nicht beschrieben worden sind.

Material und Methodik

Die Zwiebelknollen dieser beiden Liliaceenarten stammen aus dem Botanischen Garten der Universität Wien.

Tulipa silvestris ist eine Wildform; ich sammelte sie im Mai bis Juni, während sie noch beblättert war, in den Rasenflächen im oben genannten Garten. *Colchicum speciosum* ist eine aus Asien stammende Kulturform. Sie wurde im Mistbeet gezogen, ich sammelte sie ebenfalls beblättert zur gleichen Zeit wie *Tulipa silvestris*.

Beide Pflanzen besitzen als überwinterungsfähiges Organ eine Zwiebelknolle, die in der Frühjahrsvegetationsperiode von der sehr fleischigen schuppenförmigen Blattbasis des ersten Laubblattes eingehüllt wird. An

der Innenepidermis dieses Blattes konnte ich die im folgenden beschriebenen Idioblasten feststellen.

Zur Methodik sei erwähnt, daß die Schuppen mit dem bereits in Stücken geschnittenen, jedoch noch anhaftenden einschichtigen Häutchen in der zu verwendenden Farblösung zuerst mit der Wasserstrahlpumpe infiltriert und nachher zehn Minuten darin belassen wurden.

Eigene Beobachtungen

Behandelt man auf diese Weise Präparate der Innenepidermis von *Tulipa* mit Neutralrot 1 : 10.000, pH 7,1, so zeigt sich ein eigenartiges Verhalten. Die Mehrzahl, ca. 80—90%, der Zellen sind schwach erdbeerrot gefärbt und zeigen schwache Allgemeinkontraktion. Aus dem Gesamtbild jedoch stechen etwa 10—20% der Zellen mit intensiver karminroter Färbung hervor. Sie zeigen dabei sehr schöne Vakuolenkontraktion, die fast hundertprozentig auftritt. Dabei sind jedoch die Menisken der Vakuolen nicht wie bei einer normalen Spontankontraktion schön gerundet, sondern meist ein wenig konkav gebuchtet oder eingeschnürt (Abb. 1). Manchmal sieht es auch aus, als ob zuerst eine Aufteilung in drei oder mehrere Vakuolen erfolgt sei, die sich jedoch wieder fest aneinandergelegt haben.

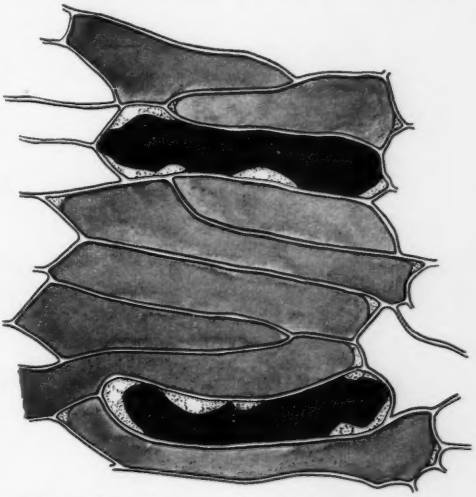


Abb. 1. *Tulipa silvestris*, in Neutralrot 1 : 10.000, pH 7,1. Die stark kontrahierten Vakuolen sind unregelmäßig eingebuchtet.

Die Abhebung der Vakuolen erfolgt nicht nur in der Längsausdehnung der Zelle, sondern meist auch in geringem Ausmaß von der Längsseite der Zelle her. Dabei ist aber zu beobachten, daß die Vakuole trotz scheinbarer festerer Konstitution nicht die Form der Zellen beibehalten, wie das bei Objekten mit festen oder gelartigen Zellsäften (Weber 1933, Hofmeister 1940) der Fall ist.

Teilweise konnten auch bei *Tulipa silvestris* Zellen gefunden werden, die zwei- oder dreigeteilte Vakuolen aufwiesen, welche sogar vereinzelt durch dünne Fäden miteinander verbunden waren. Auch treten in den Plasmaräumen noch eine Anzahl von kleinen und ungefärbten Teilvakuolen auf.

Führt man die Färbung an dem gleichen Objekt mit Chrysoidin, 1 : 10.000, pH 7,1, durch, so kommt es zu ähnlichen Bildern. Die Idioblasten

mit vollen Zellsäften sind intensiv gelbbraun gefärbt und zeigen eine schöne, fast hundertprozentig auftretende Vakuolenkontraktion.

Eine Messung des Kontraktionsausmaßes ergibt einen Unterschied zwischen der Vakuolenkontraktion mit Neutralrot und der mit Chrysoidin. Bei ersterer erreicht die Kontraktion der Vakuole nur ein Ausmaß von 90% der Zelle, während bei letzterer eine Kontraktion von ca. 81% erreicht wird. Ein Unterschied besteht auch darin, daß die Vakuole bei der Chrysoidinfärbung stets mit schönen runden Menisken kontrahiert ist. Das Plasma hingegen bleibt wandständig und nur einzelne Plasmafäden ziehen zur Vakuole (Abb. 2).

Das zweite Objekt, *Colchicum speciosum*, zeigt ein ähnliches Verhalten. Bei einer Behandlung mit Neutralrot ergibt sich färberisch folgendes Bild. Die Zellen der Innenepidermis haben ungefähr knochenartige Gestalt. Der Schnitt selbst zeigt nach Färbung mit Neutralrot in der Regel zwei Arten

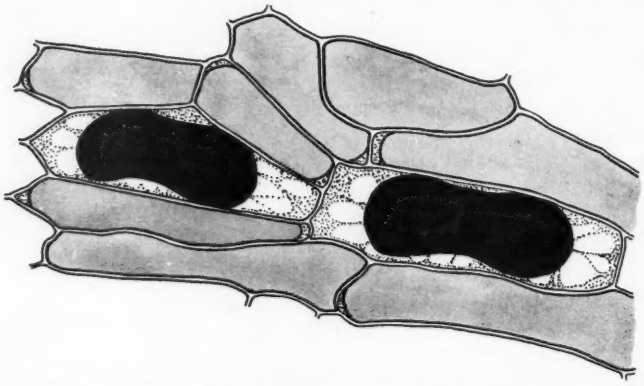


Abb. 2. *Tulipa silvestris*, in Chrysoidin 1 : 10.000, pH 7,1. Kontrahierte Vakuolen abgerundet, das Plasma von farblosen Vakuolen durchsetzt. Zellen mit leeren Zellsäften nicht gefärbt.

von Zellen: solche mit leeren Zellsäften, die erdbeerrot gefärbt sind und in den wenigsten Fällen eine Vakuolenkontraktion zeigen, und Idioblasten mit vollen Zellsäften. Letztere sind karmin- bis purpurrot gefärbt und nehmen fast 30—50% der ganzen Schnittfläche ein. Ihre Menisken sind selten sehr schön gerundet und zeigen oft die eigenartige, auch bei *Tulipa silvestris* zu beobachtende malachitartige und zerklüftete Form. Häufig jedoch sind auch Zellen unter ihnen, deren Vakuolen eigenartig eingebuchtet sind. Das Bild erinnert lebhaft an eine Krampfplasmolyse. Der Tonoplast ist an vielen Stellen, auch an den Enden in der Längsausdehnung der Zelle, nicht abgehoben, dafür zeigen sich unregelmäßige, kleinere und größere konkav eingedellte Höfe an den verschiedensten Stellen. Sie buchten den Tonoplasten nicht in einer senkrecht zur Aufsicht der Beobachtungsebene der Zelle durchgehenden Hofform ein, sondern es zeigt sich bei genauerer Beob-

achtung, daß sich die Vakuole unterhalb der Einbuchtung fortsetzt. Die Ecken sind hier vollkommen mit Plasma ausgefüllt, die BMB in diesen ist nicht sehr lebhaft. Bei vielen Zellen jedoch, namentlich bei solchen, die schon

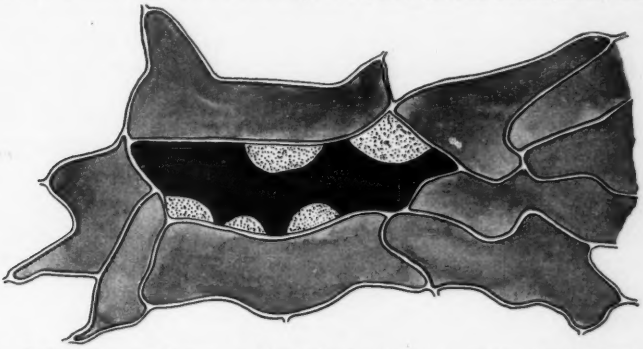


Abb. 3. *Colchicum speciosum*, in Neutralrot pH 7,1, 1 : 10.000. Starke konkav eingebuchtete Vakuolenkontraktion, selten Teilvakuolen im gequollenen Plasma.

sehr große Plasmahöfe aufweisen, kommt es zur Ausbildung von mächtigen Vakuolen im Plasma, die teilweise gefärbt sind, teilweise auch ungefärbt sein können (Abb. 3).

Legt man derart kontrahierte Zellen in ein Plasmolytikum, z. B. in 1,0 Mol Traubenzukker, so zeigt sich nach etwa 15 Minuten eine schöne Plasmolyse, in deren Verlauf sich der Tonoplast schön abrundet.

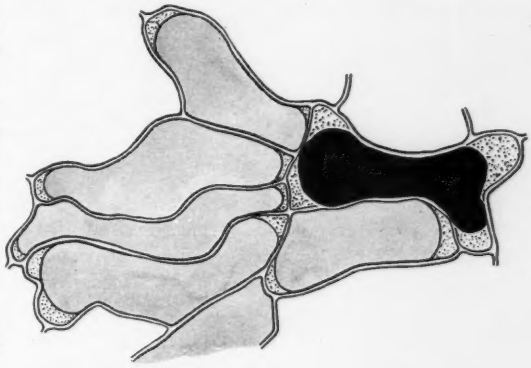


Abb. 4. *Colchicum speciosum*, Chrysoidin 1 : 10.000, pH 7,1. Vakuolen schön rund kontrahiert. Zellen mit leeren Zellsäften nicht gefärbt.

Unter den Zellen finden sich auch etwa 20%, die bereits in der Vakuole eine starke Tröpfchenspeicherung aufweisen. In diesen Zellen kommt es zu keiner Kontraktion. Es handelt sich wohl um ein Nekrosestadium. Ähnliches wird erreicht, wenn man die intakten Zellen durch Druck auf das Deckglas schädigt.

Entsprechende Versuche, unter den gleichen Bedingungen wie bei Neutralrot mit Chrysoidin 1 : 10.000, pH 7,1, durchgeführt, zeigten ebenfalls in der gleichen Epidermis bei etwa 30—40% aller Zellen schöne gelbbraune Färbung. Diese Zellen mit vollen Zellsäften waren fast zu 100% kontrahiert. Die Menisken der Vakuolen waren meist schön gerundet, Tröpfchen-

speicherung trat fast nirgends auf. Selten gab es kleine Einbuchtungen konkaver Form. Der Zellsaft zeigte keine Entmischungskugeln, sondern blieb stets schön klar. Das Plasma war gleichmäßiger und anscheinend weniger aufgequollen, ohne Teilvakuolen zu enthalten. Nur vereinzelt traten bei den konkav eingebuchteten Vakuolen im Plasma Teilvakuolen auf (Abb. 4). Die ungefärbten Zellen zeigen gleichfalls Allgemeinkontraktion. Diese erreicht bei einzelnen Zellen den gleichen Grad wie bei den vitalgefärbten Zellen.

Es ist allgemein bekannt, daß die Außen- und Innenepidermen von *Allium cepa* bei Vitalfärbung unterschiedliches Verhalten zeigen (Wiesner 1950, Küster 1942, Drawert 1938, 1940). Man bezeichnet demnach die sich beispielsweise mit Neutralrot lilarot anfärbenden Zellen der Außenepidermis als Zellen mit vollen Zellsäften, die sich erdbeerrot färbenden Zellen der Innenepidermen als solche mit leeren Zellsäften. In den nun von mir behandelten Objekten treten beide Zelltypen in der Innenepidermis nebeneinander auf. Den Beweis hiefür bringt die Fluoreszenzmikroskopie. Beobachtet man Zellen dieser Innenepidermis, die mit Neutralrot (pH 7,1) gefärbt wurden, unter dem Fluoreszenzmikroskop, so zeigen die Idioblasten mit vollem Zellsaft eine schöne kräftige Rotfluoreszenz, während die Zellen mit leeren Zellsäften nicht merklich aufleuchten (Toth 1952). Chrysoidin hingegen ist kein Fluoreszenzfarbstoff. Da jedoch auch hier bei der Vitalfärbung in diesem Falle die gleichen unterschiedlichen Zelltypen, also stark angefärbte und schwach oder gar nicht gefärbte Zellen auftreten wie bei Neutralrot, so handelt es sich auch hier um die unterschiedliche Färbung von vollen und leeren Zellsäften.

Zusammenfassung

Die Innenepidermis des die Zwiebel von *Tulipa silvestris* und *Colchicum speciosum* umhüllenden ersten Laubblattes weist zwei Arten von Zellen auf, solche mit leeren speicherstofffreien Zellsäften und dazwischen Idioblasten mit vollen, d. h. speicherstoffführenden Zellsäften. Die letzteren färben sich mit basischen Farbstoffen wesentlich intensiver an als erstere.

Färbt man *Tulipa silvestris* mit Neutralrot 1 : 10.000, pH 7,1, in aqua dest., so zeigt sich bei den vollen Zellsäften eine starke Vakuolenkontraktion, die jedoch keine gerundeten Menisken aufweist, sondern meist malachitartig eingeschnürte Tonoplasten zeigt. Ähnliche unregelmäßige Vakuolenkontraktion erhält man auch bei *Colchicum speciosum* bei der gleichen Färbung. Nur sind hier die Tonoplasten ähnlich wie bei einer Krampfplasmolyse stark eingebuchtet.

Bei Färbung mit Chrysoidin bei gleichem pH und gleicher Konzentration erhält man ein wesentlich anderes Bild. Die Menisken der kontrahierten Vakuolen sind in jedem Falle schön gerundet.

Die Kontraktion erreicht mit Chrysoidin einen stärkeren Grad als mit Neutralrot. Die Vakuole nimmt bei *Tulipa silvestris* in Neutralrot 90%, in

Chrysoidin 81%, bei *Colchicum speciosum* in Neutralrot 96% und in Chrysoidin 88% vom Zellvolumen ein.

Literatur

Drawert, H., 1938: Beiträge zur Entstehung der Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung mit Neutralrot. Ber. Dtsch. Bot. Ges. *56*, 123.

— 1940: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende Pflanzenzelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora *134*, 159.

Gicklhorn, J., und F. Weber, 1927: Über Vakuolenkontraktion und Plasmolyseform. Protoplasma *28*, 528.

Höfler, K., 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie *2*, 13.

— 1949: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. Biologia generalis *19*, 90.

Hofmeister, L., 1940: Mikrurgische Untersuchungen an Borraginoideenzellen. Protoplasma *35*, 61.

Küster, E., 1942: Vitalfärbung und Vakuolenkontraktion. Zeitschrift wiss. Mikroskopie *58*, 78.

Toth, A., 1952: Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht. Protoplasma *41*, 103.

Weber, F., 1935: Vakuolenkontraktion der Borraginaceen-Blütenzellen als Synärese. Protoplasma *22*, 4.

Wiesner, G., 1950: Untersuchungen über Vitalfärbung von *Allium*-Zellen mit basischen Hellfeldfarbstoffen. Protoplasma *40*, 405.

Über die Toxizität einiger Fluorochrome

Von

M. Wiede und F. Meyer

Aus dem Anatomischen und dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg

(Eingelangt am 26. Juli 1954)

Vitalfärbungsversuche mit Fluorochromen haben neuerdings auch an der tierischen Zelle zu morphologisch wie zellphysiologisch bemerkenswerten Befunden geführt. Die kritische Wertung und die Deutung solcher Ergebnisse erfolgt meist nur unter Berücksichtigung der physikalisch-chemischen Bedingungen der Farbspeicherung, sie sollte jedoch auch mehr als bisher die möglichen toxischen Wirkungen der Farbstoffe auf Zellstruktur und Zellstoffwechsel berücksichtigen. Voraussetzung für eine Beurteilung in dieser Hinsicht sind quantitative Angaben über den Grad der Toxizität.

Bei Bakterien und Zellen höherer Pflanzen wurde dieser Frage schon nachgegangen. Abgesehen von günstigen Objekten, z. B. Spermien und in vitro gezüchteten tierischen Zellen, an denen sich nach Behandlung mit Farbstofflösungen bestimmter Konzentration toxisch bedingte Veränderungen nachweisen lassen, sind Toxizitätsbestimmungen an und für bestimmte tierische Zellarten in vivo et in situ nicht ohne weiteres möglich. Die ungünstigen Beobachtungsbedingungen spielen dabei eine geringere Rolle als die wechselnden Anfärbungsbedingungen verschiedener Zellarten. Denn auf Grund der unterschiedlichen Permeationsverhältnisse und des verschiedenen Ausmaßes spezifischer Adsorptionsflächen für einen bestimmten Farbstoff ist, gleichgültig auf welche Weise er angeboten wurde, seine Konzentration in jeder Zellrasse und damit die toxische Wirkung der angewandten Dosis für jede Zellart eine sehr verschiedene.

Das mag der Grund sein, warum die Dosis letalis und die Dosis toxica der Vitalfarbstoffe in der Cytologie wenig Beachtung gefunden haben. In der Literatur fehlen solche Daten oder sie sind im Laufe der Zeit in Vergessenheit geraten. Vielmehr findet sich die Meinung, man dürfe an Bakterien und Pflanzenzellen gewonnene Erfahrungen über die Giftigkeit von Farbstoffen auf die tierische Zelle übertragen. Stellt auch die Toxizitätsbestimmung pro kg Körpergewicht nur eine Bauschanalyse dar, so ist sie solchen Verallgemeinerungen doch vorzuziehen und sollte berücksichtigt wer-

den, zumal sie auch Anhaltspunkte bei der Auswahl der für Vitaluntersuchungen geeigneten Farbstoffdosen und für die Beurteilung ihrer Auswirkung auf eine bestimmte Zellart zu geben vermag.

Wenn im folgenden über die Toxizität einiger Fluorochrome für die weiße Maus berichtet wird, so deshalb, weil die Maus neben der Ratte das gebräuchlichste Objekt für Vitalbeobachtungen ist und weiter, weil die in der Literatur angegebenen Daten über die Giftigkeit der unten genannten Farbstoffe sehr lückenhaft sind.

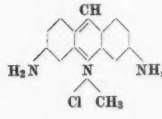
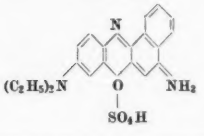
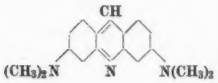
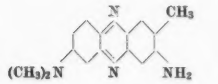
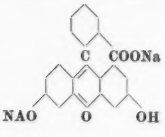
Die Auswahl der Farbstoffe erfolgte von dem Gesichtspunkt aus, mit einer kleinen Zahl von Fluorochromen eine gewisse Variation physikalisch-chemischer Eigenschaften zu erfassen, um nicht allein die unterschiedliche Wirkung von Farbstoffen, sondern vielleicht auch die bestimmter chemischer bzw. physikalisch-chemischer Eigenschaften dieser Substanzen vergleichen zu können. Das war bei Prüfung von Acridinorange, Trypaflavin, Fluorescein-Natrium, Neutralrot und Nilblausulfat in einem gewissen Grade möglich, denn in dieser Reihe sind basische und saure, lipophile und hydrophile, verwandte und Farbstoffe von chemisch differenter Konstitution einander gegenübergestellt. Hinsichtlich der Fähigkeit sich jeweils in ganz verschiedenen und spezifischen Zellbestandteilen anzureichern und sie damit auch zu schädigen, besitzt diese Auswahl ebenfalls eine gewisse Vielseitigkeit.

Eine exakte Aussage über die akute Toxizität der gewählten Farbstoffe und vor allem über das Verhältnis der gefundenen Werte zueinander war nur durch eine vergleichende Untersuchung möglich, bei der definierte, für alle Stoffe gleiche Versuchsbedingungen eingehalten werden.

Bei der Durchführung der Versuche gingen wir so vor, daß wir die genannten, in destilliertem Wasser gelösten Farbstoffe an insgesamt 430 weiße Mäuse mit einem Körpergewicht zwischen 15 und 25 g intraperitoneal verabfolgten. Das Volumen der injizierten Lösung wurde konstant gehalten und betrug 0,2 cm^3/10 g Körpergewicht. Variiert wurde lediglich die Konzentration der Farbstofflösungen. Sie wurde so eingestellt, daß die verschiedenen, in nachstehender Tabelle 1 genannten und in mg/kg umgerechneten Dosen jeweils in 0,2 cm^3 enthalten waren. Die Zahl der verendeten Tiere wurde 3, 6 und 24 Stunden sowie 2, 3, 5, 7, 10, 14 und 20 Tage nach der Injektion festgestellt, um so über den Ablauf der Vergiftung Auskunft zu erhalten. Der Tod der mehr als 20 Tage nach der Behandlung gestorbenen Tiere konnte nicht mehr mit Sicherheit auf die Verabfolgung der Farbstoffe zurückgeführt werden, so daß wir uns aus diesem Grunde und weiter, weil diese wenigen Tiere das Ergebnis praktisch nicht mehr beeinflußten, für berechtigt halten, die Zahl der nach Ablauf von 20 Tagen verendeten Tiere als Maß für die unmittelbare Giftwirkung der untersuchten Stoffe anzusehen.

Die beobachteten Vergiftungserscheinungen ließen eine Zuordnung bestimmter Symptome zu einem Stoff nicht zu. Kurze Zeit nach der Injektion toxischer Dosen kam es zu Lähmungserscheinungen, besonders der hinteren Extremitäten, von denen sich nur ein Teil der Tiere erholte. Diese sowie

Tabelle 1.

Stoff	Dosis in mg/kg	Zahl der unters. Tiere	Tote nach 3 h	6 h	24 h	2 Tg	3 Tg	5 Tg	7 Tg	10 Tg	14 Tg	20 Tg	Überlebende	in Prozenten
Trypaflavin 	1	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	100
	10	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	100
	20	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	100
	25	10	—	—	—	—	2	—	1	—	—	—	7	70
	30	10	—	—	—	—	1	—	—	—	2	—	7	70
	32,5	10	—	2	1	1	3	1	—	—	—	—	2	20
	35	10	—	—	3	6	—	1	—	—	—	—	0	0
	35	10	—	—	3	5	1	1	—	—	—	—	0	0
	40	10	—	—	3	—	1	4	—	—	—	1	1	10
	100	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
Nilblausulfat 	10	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—
	50	13	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	12	93
	60	10	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	8	80
	70	10	1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	8	80
	75	10	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6	60
	90	10	5	—	1	—	2	—	—	—	—	—	2	20
	100	13	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	38,45
	180	10	5	—	1	—	—	—	—	—	—	—	4	40
	500	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
Acridinorange 	1	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	100
	10	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	100
	100	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	100
	150	10	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	9	90
	200	13	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	12	92,28
	225	10	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	8	80
	250	10	—	—	2	—	4	2	—	—	—	—	2	20
	300	10	—	1	2	—	1	2	1	—	—	—	3	30
	350	10	—	2	3	—	2	2	1	—	—	—	0	0
	400	13	1	3	5	3	1	—	—	—	—	—	0	0
	600	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
Neutralrot 	10	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	100
	100	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	100
	300	13	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	12	92,3
	400	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13	100
	450	10	—	—	—	—	3	2	—	2	—	1	2	20
	475	10	—	—	—	1	1	2	—	—	—	—	6	60
	500	13	—	—	—	—	2	4	2	1	—	—	4	32,5
	600	13	—	—	—	—	4	7	—	—	—	—	2	15,4
	700	3	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	1	—
	800	3	—	—	—	—	1	2	—	—	—	—	0	0
	1000	3	—	—	—	—	2	1	—	—	—	—	0	0
Fluorescein-Natrium 	1000	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13	100
	1500	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	100
	2000	13	—	—	1	2	1	—	—	—	1	1	7	53,8
	2100	10	1	—	—	—	—	—	—	—	—	2	7	70
	2300	10	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	8	80
	2400	10	2	3	2	—	—	—	—	—	—	—	3	30
	2500	10	3	3	3	—	—	—	—	—	—	—	1	10
	3000	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0

die mit kleineren Dosen behandelten schienen deutlich sedativ beeinflußt. Die Motilität war für mehrere Tage, bei den mit letalen Dosen behandelten

Tieren bis zum Eintritt des Todes, herabgesetzt. Eine nennenswerte Verminderung der Nahrungsaufnahme (Brot, Hafer und Wasser ad libidum) haben wir indessen nicht beobachtet.

Aus den in Tabelle 1 zusammengefaßten Ergebnissen geht hervor, daß sich Trypaflavin, Nilblausulfat, Acridinorange, Neutralrot und Fluorescein-Natrium nicht nur in ihrer Giftigkeit für Mäuse ganz erheblich voneinander unterscheiden, sondern offenbar auch durch ein verschiedenes Schicksal im Organismus, z. B. in der Geschwindigkeit des Wirkungseintritts.

Fluorescein-Natrium und vor allem Nilblausulfat erwiesen sich unter den genannten Versuchsbedingungen als ausgesprochene „Frühgifte". Der Tod der hiermit behandelten Tiere trat mit verhältnismäßig wenig Ausnahmen während der ersten 24 Stunden ein. Im Gegensatz hierzu wurden die geprüften Neutralrot-Dosen von allen Tieren mehr als 24 Stunden lang überlebt. Dieser Farbstoff hat eine ausgesprochene Spättoxizität, denn er führte erst zwischen dem 3. und dem 5. Tag nach der Injektion den Tod der Tiere herbei. Das Schicksal der mit Acridinorange und Trypaflavin behandelten Tiere entschied sich im wesentlichen ebenfalls innerhalb von 5 Tagen, jedoch traten schon wenig oberhalb der sog. LD_{50} (s. unten) Todesfälle während der ersten Stunden nach der Verabfolgung ein.

Im Gegensatz zu den Angaben in der älteren Literatur über minimale und maximale tödliche Dosen, die, wie wir heute wissen, nie exakt ermittelt werden können, verwendet man seit Trevan im allgemeinen nur noch die sog. LD_{50} (= DL_{50} = Dosis letalis 50%) als Maß für die Toxizität eines Stoffes. Es ist diejenige Dosis, die gerade 50% der damit behandelten Tiere innerhalb einer vom Untersucher festgelegten Zeit (Hardebeck, Frahm u. Soehring) tötet. Obwohl dieser Begriff weniger anschaulich ist als z. B. die erwähnten minimalen und maximalen tödlichen Dosen, die heute als LD_0 oder LD_{100} bezeichnet werden, hat die LD_{50} den großen Vorteil der minimalen Streuung. Wir sind daher in der Lage, einen verläßlichen LD_{50}-Wert auch bei Verwendung eines begrenzten Tiermaterials (80 bis 100 Mäuse pro Stoff) zu finden.

Unter den zahlreichen, zur Ermittlung der LD_{50} beschriebenen Verfahren hat sich uns bei früheren Untersuchungen das von Litchfield und Wilcoxon angegebene als besonders brauchbar erwiesen. Der gesuchte LD_{50}-Wert wird graphisch ermittelt, der Richtungsfaktor der Regressionslinie (S) sowie die Streuung der LD_{50} (Str) errechnet und die Homogenität des untersuchten Tiermaterials mit Hilfe der chi^2-Methode geprüft. Das Ergebnis der nach dieser Methode durchgeführten Auswertung der erhobenen Einzelbefunde (Tabelle 1) ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Für eine Heterogenität des untersuchten Tiermaterials ergab sich kein Anhalt und die ermittelten Richtungsfaktoren erwiesen sich als nicht signifikant voneinander verschieden.

Hieraus ergibt sich zusammenfassend, daß sich die 20-Tage-LD_{50}-Werte unter den genannten Versuchsbedingungen für Trypaflavin : Nilblausulfat : Acridinorange : Neutralrot : Fluorescein-Natrium wie 1 : 2,75 : 8 : 15 : 76

verhalten. Die gefundenen Unterschiede in der Giftigkeit sind signifikant im Sinne der mathematischen Statistik.

Trypaflavin ist nach den beschriebenen Befunden zweifellos der giftigste unter den von uns untersuchten Farbstoffen. Der gefundene LD_{50}-Wert (29 mg/kg) stimmt sehr gut überein mit dem von de Bruyn, Robertson und Farr nach subcutaner Injektion für eine Beobachtungszeit von zehn Tagen ermittelten (26 mg/kg), liegt aber weit niedriger, als nach den Untersuchungen von Lenz zu erwarten gewesen wäre. Es ist richtig, daß die von dem genannten Autor angegebene Dosis letalis in Höhe von 250 mg/kg eine tödliche ist. In ihr jedoch eine LD_{100}, eine gerade eben für alle Tiere tödliche Dosis zu sehen, ist wegen der großen Streuung der Letalitätskurve in diesem Bereich nicht möglich. Die Ansicht von Ellinger und Hirt, die sich auf die Angaben von Lenz stützten und daher

Tabelle 2.

Stoff	(20Tage-) LD_{50}	$^fLD_{50}$	Str	S
Trypaflavin (Hoechst, IBEB)	29 mg/kg	1,05	27—31	1,1
Nilblausulfat (Grübler 2,54)	80 „ „	1,1	72—88	1,275
Acridinorange (Bayer 513439)	230 „ „	1,09	212—252	1,175
Neutralrot extra (Grübler)	440 „ „	1,05	404—477	1,21
Fluorescein-Natrium (Hollborn 286—9)	2200 „ „	1,09	2020—2400	1,22

glaubten, mit einem Fünftel dieser Dosis keinerlei toxische Schädigung gesetzt zu haben, trifft somit nicht zu. Die zur Erzeugung bestimmter Fluorochromierungseffekte notwendige, von Ellinger und Hirt auch verwendete Trypaflavindosis von 50 mg/kg ist fast doppelt so groß wie die LD_{50} und liegt eindeutig im Bereich der LD_{100} oder darüber. Nach Verabfolgung derselben würden somit — unter der Voraussetzung einer ausreichend langen Beobachtungszeit — mit Sicherheit weit mehr als 50% der Tiere sterben. Eine solche Lebendbeobachtung ist infolgedessen an einem schwerkranken Tier vorgenommen worden und darum in ihrem Wert beträchtlich eingeschränkt.

Acridinorange ist nach unseren Untersuchungen 8mal, nach de Bruyn und Mitarbeitern mehr als 20mal weniger giftig als Trypaflavin. Hieraus ergeben sich gegenüber Trypaflavin wesentliche Vorteile für seine Verwendungsfähigkeit als Fluorochrom, denn bei der für Injektionen üblichen Dosierung von 1 cm^3 einer Acridinorangelösung 1 : 500 bis 1 : 1000 pro 20 g Maus = 50 bis 100 mg/kg Körpergewicht wird der Wert der von uns errechneten LD_0 noch nicht erreicht. Aber schon das Doppelte bis Vierfache der genannten Dosis führt den Tod von mehr als 50% der Tiere herbei. Es bestehen daher Bedenken, Acridinorange zu den „ungiftigsten Vitalfarben, über welche wir in der Biologie verfügen“ (Strugger), zu zählen. Diese Ansicht, die für Pflanzen und gewisse Bakterienarten Geltung haben mag, darf nicht ohne weiteres auf tierische Zellen in vivo und in vitro übertragen werden.

Günstiger liegen die Verhältnisse beim Neutralrot. Die LD_{50} für diesen Farbstoff ist etwa 9mal so hoch wie z. B. die für die Vitalfärbung des Pankreas der Maus übliche Farbstoffmenge. Diese Dosis (50 mg/kg) liegt weit unterhalb der LD_0.

Am ungiftigsten von den untersuchten Farbstoffen ist das Fluorescein-Natrium (Hollborn). Die von uns errechnete LD_{50} betrug 2200 mg/kg und ist somit fast 4mal größer als die von Jodlbauer und Busck angegebene tödliche Dosis (0,6 g/kg Maus). Es bleibt unentschieden, ob diese Differenz in der Herkunft des Farbstoffes oder in anderen Versuchsbedingungen liegt. Unabhängig davon erfüllt dieser Farbstoff die für seine vitalfärberische Verwendungsfähigkeit notwendige Voraussetzung der Ungiftigkeit (Ellinger und Hirt).

Das Nilblausulfat unterscheidet sich als stark lipoidlöslicher Farbstoff von allen anderen hier untersuchten. Er ist relativ giftig. Diese Tatsache gewinnt an Bedeutung, weil es neuerdings gelungen ist, mit Nilblausulfat Mikrosomen von Pflanzenzellen elektiv darzustellen (Drawert). Sollten diese Zellbestandteile auch in der tierischen Zelle der Angriffspunkt des Farbstoffes sein, so darf sein Wirkungsmechanismus als Blockade dort lokalisierter Enzymsysteme aufgefaßt werden. Bei dem hohen Lipoidgehalt der Mikrosomen, der etwa 43% ihres Trockengewichtes beträgt (Lit. bei Lindberg und Ernster), ist das nicht unwahrscheinlich. Auch nach Anwendung von Nilblausulfat tritt der Tod der Versuchstiere sehr viel früher als nach Acridinfarbstoffen oder Neutralrot ein.

Die Ursachen für die unterschiedliche Toxizität der untersuchten Farbstoffe sind wegen des verwickelten chemischen Aufbaus der verschiedenen Farbstoffmoleküle und den daraus resultierenden chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften außerordentlich zahlreich und komplex. Hinzukommt, daß auch die Bedingungen, die das Substrat für Permeation und Adsorption der Farbstoffe bietet, nicht minder vielseitig sind. Von großer Bedeutung erweist sich der Ladungscharakter der Fluorochrome.

Es stehen sich also, dem Grad ihrer toxischen Wirkung nach, basische und saure Farbstoffe gegenüber. Daß saure Farbstoffe, hier repräsentiert durch das Fluorescein-Natrium, relativ wenig giftig sind, verdanken sie wohl dem Umstand, daß sie schneller ausgeschieden werden, weil für sie geeignete Adsorptionsbedingungen sich in der Zelle nicht in dem Umfang wie für basische finden. Die höhere Giftigkeit der basischen Farbstoffe beruht vor allem darauf, daß jede Zelle basophile Substrate von relativ großer Oberfläche enthält, deren Blockade einen empfindlichen, unter Umständen lebensbedrohenden Eingriff in den Zellstoffwechsel darstellt. Solche, zumeist Nucleinsäuren enthaltende Substrate kommen reichlich im Kern, aber auch im Cytoplasma vor. Freilich sind Grad und Ort der Speicherung offensichtlich noch von anderen Eigenschaften des Farbstoffmoleküls und auch der Substrate abhängig.

So ist z. B. das Trypaflavin von hoher und spezifischer Kernwirksamkeit. Da es an den Chromosomen selbst angreift und diese durch Veränderung ihres kolloidchemischen Zustandes irreversibel schädigt (Bauch), verkörpert

es unter den Mitosegiften den Typ des Chromosomengiftes. Die Mitoseschädigung scheint im Vordergrund der Trypaflavinwirkung zu stehen. Hinter ihr tritt die Cytoplasmaschädigung zurück (Lettré, Bucher). Zweifellos bieten sich dem Trypaflavin aber auch im Cytoplasma Angriffsorte, denn Hirt, Ansorge und Markstahler konnten an der lebenden Leberzelle der Ratte mit Trypaflavin distinkte Stäubchen anfärben, die sie für Mitochondrien hielten. Möglicherweise beruht die höhere Giftigkeit des Trypaflavins im Vergleich zum Acridinorange darauf, daß es längere Zeit und längere Zeit in höherer Konzentration in den Kernen vieler Organe nachweisbar bleibt (de Bruyn und Mitarbeiter).

Dem Acridinorange kommt keine (Lettré) oder eine schwächer mitosehemmende Wirkung (Stockinger) zu. Fluoreszenzoptisch läßt sich seine intensive Speicherung in nucleotidhaltigen Substraten von Kern und Cytoplasma nachweisen (Gössner sowie Zeiger, Harders und Müller). Eine partielle oder totale Hemmung von Stoffwechselvorgängen in der Zelle durch Blockade dort lokalisierter Enzymsysteme durch den Farbstoff ist durchaus denkbar. So läßt sich die Ausscheidung von Farbstoffen in die Galle durch Blockade der Leberzelle mit Acridinorange zeitweilig oder dauernd unterbinden (Zeiger und Wied). An in vitro gezüchteten Zellen kommt es nach Intoxikation mit Acridinorange neben Mitosestörungen zu morphologisch faßbaren Veränderungen des Cytoplasmas und der Mitochondrien (Stokkinger).

Das Neutralrot soll, angeblich auf Grund seines ähnlichen chemischen Aufbaus, in der Art seiner Wirkung dem Acridinorange verwandt sein (Stockinger). Es wird bevorzugt im Cytoplasma gespeichert. Am Epithel von Salamanderlarven stört es den Ablauf von Kernteilungen (Politzer).

Zusammenfassung

1. Es wurde eine vergleichende Bestimmung der Toxizität von Trypaflavin, Acridinorange, Neutralrot, Nilblausulfat und Fluorescein-Natrium an 430 weißen Mäusen durchgeführt.

2. Als Maß für die Giftigkeit wurde die LD_{50} der Farbstoffe ermittelt. Sie beträgt für Trypaflavin 29 mg/kg, für Nilblausulfat 80 mg/kg, für Acridinorange 230 mg/kg, für Neutralrot 440 mg/kg und für Fluorescein-Natrium 2200 mg/kg. Damit verhält sich die Toxizität dieser Fluorochrome wie 1 : 2,75 : 8 : 15 : 76.

3. Fluorescein-Natrium und vor allem Nilblausulfat erwiesen sich als „Frühgifte", Neutralrot, Acridinorange und Trypaflavin sind Stoffe mit Spättoxizität.

4. Einige der Ursachen für die unterschiedliche Toxizität werden erörtert.

5. Die LD_{50} wird in Beziehung gesetzt zu den üblichen, in der Fluoreszenzmikroskopie verwandten Farbstoffdosen. Es zeigt sich, daß bei dieser Dosierung die Ld_{50} von Trypaflavin um das 2- bis 4fache überschritten wird, während die zur Vitalfluorochromierung injizierten Acridinorange-, Neutralrot- und Fluorescein-Natrium-Dosen etwa die Hälfte, $^1/_4$ bzw. $^1/_{20}$ der LD_{50} betragen bzw. im Bereich der LD_0 oder darunter liegen.

Literatur

Bauch, R., 1948: Planta *35*, 536.
de Bruyn, P. P. H., R. C. Robertson, and R. S. Farr, 1950: Anat. Rec. *108*, 279.
Bucher, O., 1939: Z. Zellforsch. *29*, 285.
Drawert, H., 1952: Ber. Dtsch. Bot. Ges. *65*, 263.
Ellinger, Ph., und A. Hirt, 1929: Z. Anat. u. Entwicklungsgesch. *90*, 791.
Gössner, W., 1949: Verh. Dtsch. Ges. f. Path. 33. Tg. Kiel.
Hardebeck, K., M. Frahm und K. Soehring, 1951: Arch. int. pharmacodyn. *86*, 472.
Hirt, A., J. Ansorge und H. Markstahler, 1939: Z. Anat. u. Entwicklungsgesch. *109*, 1.
Jodlbauer, A., und G. Busck, 1906: Arch. int. pharmacodyn. *15*, 263.
Lenz, E., 1921: Z. exper. Med. *12*, 195.
Lettré, H., 1950: Erg. Physiol. *46*, 379.
Lindberg, O., and L. Ernster: Protoplasmatologia Bd. III, Teil A. Heft 4. Wien, Springer-Verlag.
Litchfield, J. T. jr., and F. Wilcoxon, 1949: J. Pharmacol. Exper. Therap. *96*, 99.
Politzer, G., 1924: Z. Zellforsch. *1*, 644.
Stockinger, L., 1953: Z. mikr.-anat. Forsch. *59*, 304.
Strugger, S., 1949: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Verlag M. & H. Schaper, Hannover.
Zeiger, K., H. Harders und W. Müller, 1951: Protoplasma *40*, 76.
Zeiger, K., und M. Wiede, 1954: Z. Zellforsch. *40*, 401.

Untersuchungen über Wundreizreaktionen an Pflanzen

Von

Magda Ziegler

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

Mit 5 Textabbildungen

(Eingelangt am 10. Juli 1954)

1. Einleitung

Nach Verwundung von Pflanzen oder Pflanzenteilen treten in Zellen mehrere Veränderungen auf: Die Vergrößerung des Kerns (Nestler, Ritter und dort zitierte Literatur), größere Plasmadichte an der der Wundstelle zunächst liegenden Seite der Zellen (Ritter), Verlagerung des Kerns nach den entsprechenden Punkten (Tangl, Nestler, Miehe, Loos und dort zitierte Literatur), Temperatursteigerung der traumatisch gereizten Gewebe (Drawert und dort zitierte Literatur) und die Zunahme der Eiweiße bzw. Nucleoproteide (Zaleski, Kovchoff).

Diese durch einen traumatischen Reiz bedingten Veränderungen sollen an einem Objekt zeitlich genau festgehalten werden, um einen Einblick in ihre ursächlichen Zusammenhänge zu gewinnen.

Das Untersuchungsobjekt mußte große, möglichst langgestreckte Zellen haben, deren Kerne sich in der Mitte der Zellen befinden. Die Präparation der Zellen zur Weiteruntersuchung mußte außerdem ohne traumatischen Reiz möglich sein.

Diese Voraussetzungen bietet die morphologische Oberseite der Zwiebelschuppe von *Allium cepa*.

In zwei Fällen, in denen sich die Epidermis bei sehr jungen Zwiebeln noch schwer ablösen ließ, wurden Kernübertritte von einer Zelle in die andere beobachtet. In der Folge fanden daher zu den Versuchen nur ausgewachsene Zwiebeln Verwendung. Bei ihnen liegen 70% der Zellkerne im mittleren Drittel der Zelle und nur ungefähr 3% in der Nähe der Querwände.

Die Zwiebeln wurden im allgemeinen in acht gleiche Teile geschnitten, dann die Schale abgehoben und an jedem Teilstück in gleicher Höhe je eine kleine Wunde mit einer Rasierklinge quer zur Längsrichtung der Epidermiszellen geschnitten. Die Objekte wurden in Petrischalen, die mit feuchtem Fließpapier ausgelegt waren, im Arbeitsraum aufbewahrt. Die Untersuchungen erfolgten in

verschiedenen Abständen, meist sofort, nach einer halben, einer, zwei, vier, acht, sechzehn und zweiunddreißig Stunden. Fixiert wurde nach Bouin. Die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin nach Mayer und Nachfärbung mit 0,1%igem Erythrosin, wobei zeitlich gleichlange Fixierung und Färbung besondere Beachtung finden mußte.

Wenn nur die Lage des Kernes in der Zelle festgestellt werden sollte, wurde mit Karminessigsäure gefärbt.

Die statistische Sicherung erfolgte nach K. Pätau. Bei der Methode gilt der Wert $p > 0{,}0027$ als statistisch gesichert.

2. Größenänderung der Kerne

Um die Größenänderung der Kerne nach Verwundung darzustellen, wurden die Kerne der der Verwundung benachbarten Zellreihe sofort und nach 1, 2, 4, 8, 16 und 32 Std. gemessen und die Volumina berechnet.

Die Kerne der angefertigten Präparate wurden mit Hilfe des Zeichenmikroskopes gezeichnet und die Durchmesser der Kerne gemessen, die in der Aufsicht zu sehen waren. Bei 30 Kernen in Seitenansicht konnte ein Querdurchmesser von $6{,}5 \pm 0{,}03$ festgestellt werden. Mit Hilfe dieser Zahlen ließen sich die Volumina nach der Ellipsoidformel berechnen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Abb. 5 wiedergegeben.

Tab. 1. *Größenänderung der Kerne (relative Werte) in den Epidermiszellen der Zwiebel von Allium cepa nach Verwundung.*

Stunden nach dem Wundreiz	Zahl der gemessenen Kerne	Durchschnittl. Fläche bei Aufsicht	Durchschnittl. Volumina
0	99	$181{,}9 \pm 4{,}4$	771
1	95	$164{,}9 \pm 4{,}7$	717
2	100	183,8	798
4	101	194,1	840
8	97	189,6	821
16	98	$197{,}3 \pm 4{,}65$	854
32	96	196	849

Nach einer Stunde ist eine kleine Größenabnahme des Kernes festzustellen. Eine solche Reduktion beobachtete Stich bei Verdunkelung von *Acetabularia*. Er führt sie darauf zurück, daß der Kern Stoffe an das Plasma abgibt und daß er normalerweise Bausteine aus dem Protoplasma erhält, deren Synthese bei Dunkelheit unterbleibt. Bei den beschriebenen Versuchen wäre eine ähnliche Erklärung möglich.

Nach der Kernverkleinerung tritt, wohl nach restituierenden Vorgängen in der Zelle, ein Kernzuwachs bis zur 16. Std. nach Verwundung ein, während nach 32 Std. bereits eine kleine Abnahme zu sehen ist.

Nach 16 Stunden beträgt die Größenzunahme der Fläche der Kerne in Aufsicht gegenüber dem Präparat nach 1 Std. 20%. Mit $p > 0{,}0002$ ist dieser Wert statistisch gesichert.

3. Größenänderung der Nucleoli

Nach den Ergebnissen der vorausgegangenen Versuche interessierte, ob sich mit der Größe der Kerne auch die der Nucleoli verändert und ob diese Änderung gegebenenfalls in einem bestimmten Verhältnis zu der der Kerne erfolgt.

Die Kerne enthalten bei dem Untersuchungsobjekt meist zwei verschieden große Nucleoli. Dazwischen findet man Kerne mit einem verhältnismäßig großen Nucleolus. Doch wurden bei Messungen diese Kerne, sowie solche mit nicht kreisrunden Nucleoli nicht berücksichtigt. Nach Beobachtung der Kerne in den verschiedensten Lagen darf angenommen werden, daß die Nucleoli meist kugelige Gestalt aufweisen.

Die Messungen erfolgten mit Hilfe des Schraubenokularmikrometers von Leitz an den zur Messung der Kerngrößen hergestellten Präparaten (siehe unter 2).

Die Zahlen (Tab. 2 sowie Abb. 5) geben 1. den Mittelwert von je 2 Einzelmessungen an einem Nucleolus und 2. den Mittelwert von ungefähr 100 Nucleoli verschiedener Zellen.

Tab. 2. *Größenänderung der Nucleoli (relative Werte) in den Epidermiszellen der Zwiebel von Allium cepa nach Verwundung.*

Stunden nach dem Wundreiz	Zahl der gemessenen Nucl.-Paare	Durchschn. Nucl.-Inh. pro Kern	Stat. Sicherung der Größenänderung der Nucleoli bei je zwei aufeinanderfolgenden Präparaten, *p*.
0	92	71,3 ± 3,02	
½	88	74,0 ± 2,68	0,5
1	81	78,4 ± 3,66	
2	99	84,5 ± 3,94	0,08
4	103	92,6 ± 3,32	0,05
8	94	107,8 ± 3,32	0,0015
16	111	141,5 ± 3,88	> 0,0002
32	48	249,5 ± 10,28	> 0,0002

Die Messungen ergeben eine allmähliche Steigerung der Nucleolusvolumina bis zur dreifachen Größe innerhalb von 32 Std. Die Zunahme zwischen dem Ausgangswert und dem Wert nach 4 Std. ist statistisch schon gesichert.

Die Messung verschiedener Zellreihen von der Wundstelle nach rückwärts, 16 Stunden nach dem Reiz, bestätigen die Größenzunahme der Nucleolusvolumina. In den einzelnen Zellreihen war nach der Wundstelle hin eine allmähliche Zunahme derselben zu beobachten.

Auch am Ausgangsmaterial war schon kein konstantes Verhältnis von Kernen und Nucleoli zu erkennen. Zwar hatten im allgemeinen große Kerne auch große Nucleoli, jedoch zeigte sich eine sehr weite Variationsbreite.

Eine bestimmte Lage der Nucleoli im Kern und damit zur Wundstelle konnte nicht festgestellt werden.

Vergleicht man die Größenänderungen der Kerne und der Nucleoli nach Verwundung, so ergibt sich, daß zwar die Kerngröße etwas abnimmt, nicht aber die Größe der Nucleoli. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem, das Stich nach Verdunklung von *Acetabularia* erhielt. Hier nahm mit der Kerngröße auch diejenige der Nucleoli ab. Weiterhin zeigt sich, daß das Wachstum der Nucleoli erst zu dem Zeitpunkt stark einsetzt in dem die Kerne etwa ihre maximale Größe erreicht haben (vgl. Abb. 3).

Bei den Ergebnissen dieser Versuche haben wir es also mit einer relativen Vergrößerung der Nucleoli zu tun. Es ist bekannt, daß eine Korrelation zwischen Kern- und Nucleolusgröße einerseits und Plasmavermehrung andererseits besteht (Stich), und daß die Nucleoli in enger Beziehung zur Synthese des cytoplasmatischen Eiweißes stehen (Caspersson). Daher lag es nahe, im Anschluß an diese Ergebnisse die protoplasmatischen Verhältnisse der Zellen der Wundzone noch zu untersuchen.

4. Veränderung der Plasmadichte

Nach Verwundung von Zellen tritt dort bekanntlich häufig Plasmaströmung auf, bzw. wo solche schon vorhanden ist, wird sie lebhafter. Auch bei der Zwiebelepidermis von *Allium cepa* ist diese Plasmaströmung zu beobachten. Gleichzeitig ist eine Plasmaverdichtung an der der Wundstelle zugekehrten Zellwand zu sehen. Nun sollte die Plasmadichte der Zellen neben einer Wundstelle einmal in denselben Zeitabschnitten gemessen werden, in denen auch die Nucleolusgröße festgestellt wurde. So konnte man eventuell entscheiden, ob nur eine Plasmaverschiebung oder Plasmaneubildung vorliegt.

Die Präparate wurden wie zu den Messungen zur Feststellung der Kern- und Nucleolusgröße hergestellt. Sie mußten in diesem Falle besonders sorgfältig fixiert und gefärbt werden. Danach wurden sie photographiert. Die Vergrößerung wurde so gewählt, daß eine Zelle etwas breiter als der Okularausschnitt des Mikroskopes war, unter dem später die Plasmadichte gemessen wurde. Es wurde genau auf gleiche Belichtungszeit und gleiche Entwicklungsdauer der Platten geachtet. Diese wurden nun so unter das Mikroskop gelegt, daß weder eine Zellwand noch ein Kern im Blickfeld lagen. Der Spiegel des Mikroskopes wurde mit einer Mikroskopierlampe, die an einen Akkumulator angeschlossen war, aus 20 cm Entfernung beleuchtet und die im Okular vorhandene Lichtstärke mit Hilfe einer Okular-Photozelle, die an das Multiflex-Galvanometer angeschlossen war, festgestellt. Die Messungen erfolgten jeweils in einer Zellreihe von der Wundstelle nach rückwärts, d. h. den der Wundstelle entfernteren Zellen zu. In jeder Zelle wurde eine Messung an die andere gelegt, so da sich je nach Zellänge eine verschiedene Zahl ergab.

Die durchschnittlichen Werte der Meßreihen sind in Tabelle 3 und Abb. 1 zusammengestellt. Die Zahlen zeigen die Galvanometer-Ausschläge an.

In unverletzten Zellen, die jeweils zur Kontrolle mitgemessen wurden, ist bei der Plasmadichte keine Polarität festzustellen. Die Zellen haben an den beiden Enden im allgemeinen eine größere Plasmadichte, während diese in der Mitte der Zelle abfällt, in der Nähe des Kernes jedoch infolge der

sich hier sammelnden Plasmastränge wieder etwas ansteigt. Dieses Bild zeigt sich auch in der an den Wundrand angrenzenden unverletzten Zellreihe bei den beiden Präparaten, die sofort und ½ Stunde nach dem Reiz fixiert wurden.

Tab. 3. *Zunahme der Plasmadichte nach Verwundung, gemessen in Galvanometerausschlägen (vgl. Text), in der an die Wundstelle angrenzenden Zellreihe.*

Stunden nach dem Wundreiz	Durchschnittl. Galvanometerausschläge			Unterschied von A/E in %	Stat. Sicherung von A/E
	am Zellpol neben der Wundstelle	in der Zellmitte	an dem der Wundstelle entgegengesetzten Zellpol		
	A	M	E		*p*
0	13,4 ± 1,8	10,4 ± 1,59	12,1 ± 2,5	110	
½	14,1 ± 1,9	11,6 ± 1,35	12,4 ± 1,78	114	0,5
1	14,9 ± 2,4	9,6 ± 0,74	9,3 ± 0,57	160	0,008
2	24,1 ± 3,5	8,2 ± 0,83	7,0 ± 1,06	344	> 0,0002
4	14,3 ± 1,4	7,6 ± 0,79	5,5 ± 0,54	260	> 0,0002
8	12,9 ± 0,8	9,4 ± 0,51	8,8 ± 0,36	146	0,0005
16	16,7 + 2,28	10,1 ± 1,0	9,6 ± 0,85	174	0,0003

Nach 1 Stunde schon zeigt sich eine deutliche Vermehrung des Plasmas an der Spitze der 1. Zellreihe neben der Wunde. Vergleicht man die Plasma-

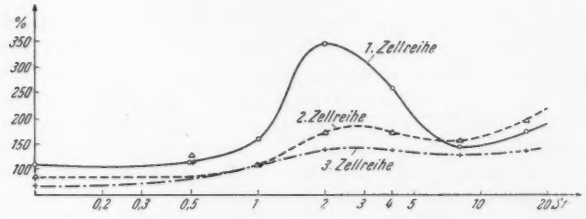


Abb. 1. Plasmadichte (Ordinate, vgl. Tabelle 3) in drei aufeinanderfolgenden unverletzten Zellreihen neben dem Wundrand. Abszisse: Stunden nach dem Wundreiz. Unter „1. Zellreihe" ist die an den Wundrand angrenzende verstanden, unter „2. Zellreihe" die nächste, unter „3. Zellreihe" die übernächste.

dichte an den beiden Enden einer Zelle, so bekommt man im allgemeinen Unterschiede von 10 bis 15%, höchstens 30%, während sie hier an diesen beiden Stellen schon 60% beträgt.

Nach 2 Stunden ist jedoch der Unterschied noch deutlicher. Die Plasmadichte an der der Wundstelle zugekehrten Seite der Zelle beträgt hier 344%.

Von diesem Zeitpunkt ab gleicht sich die Plasmadichte wieder etwas aus. Die Unterschiede können jedoch durchaus noch als statistisch gesichert angesehen werden.

Auch in der 2. und 3. Zellreihe ist die Plasmaansammlung noch deutlich erkennbar (Abb. 1). Ihr Maximum liegt zeitlich etwa gleich wie in der 1. Reihe, so daß auch hier die Auffassung bestätigt wird, daß die auf die Verwundung erfolgende Reaktion in allen Zellen gleich ausklingt, unabhängig von der Entfernung der Wunde. Die Reaktionsstärke dagegen nimmt mit der Entfernung von der Wunde ab, wie dies auch bei der Vergrößerung der Nucleolusvolumina der Fall ist. Das Maximum der Plasmaansammlung beträgt in der 2. Reihe nur noch 173%, in der 3. Reihe 140%.

Die Erhöhung der Plasmadichte nach 16 Stunden ist wohl hauptsächlich auf die Verlagerung der Kerne nach den der Wundstelle zugekehrten Zellenden zurückzuführen.

Mit der Plasmavermehrung an der einen Querwand der Zelle ist eine Plasmaverminderung an der entgegengesetzten Wand verbunden. Während die durchschnittliche Plasmadichte an den Querwänden einer Zelle über dem der Restzelle liegt, sinkt sie in den betreffenden Zellen unter diese. Wir können also einwandfrei von einer Plasmaverlagerung von der der Wundstelle abgekehrten nach der der Wundstelle zugekehrten Seite sprechen.

Auffallend ist außerdem, daß auch die Plasmadichte in der restlichen Zelle abnimmt, allerdings bei weitem nicht so stark wie an dem der Wunde abgekehrten Zellende. Der Plasmabelag der Längswände wird also wohl dünner und ein Teil dieses Belages ebenfalls nach der Wundstelle hin verlagert.

Ob an der Stelle starker Plasmaansammlung gleichzeitig auch eine Plasmaneubildung stattfindet, ist mit Hilfe dieser Messungen nicht zu entscheiden.

Färbversuche mit basophilen Farbstoffen, z. B. mit Toluidinblau zeigten nur die der Plasmadichte entsprechende stärkere Anfärbung. Bei wesentlicher Plasmasynthese müßten nach Caspersson aber die basophilen Komponenten im Plasma an den Stellen der Neubildung überwiegen, während sonst die azidophilen Komponenten vorherrschen.

Ein Vergleich mit den Veränderungen der Nucleoli nach Wundreiz ergibt außerdem, daß zu dem Zeitpunkt der starken Plasmavermehrung an der der Wundstelle zugekehrten Seite der Zelle eine Vergrößerung der Nucleoli noch kaum stattfand, daß also wohl bis jetzt auch noch keine wesentliche Plasmaneubildung erfolgte.

Auch Hettlinger, Zaleski und Kovchoff stellten fest, daß die Eiweißneubildung bei *Allium cepa* am 1. und 2. Tag nach der Verwundung gering ist und dann erst kräftig einsetzt. Das wäre also erst nach dem starken Anwachsen der Nucleoli und Kerne.

5. Ursachen der Kernverlagerung

a) Die mögliche Rolle einer chemotaktischen Anziehung durch absterbende und zerfallende Kerne

Die Verlagerung der Kerne nach Wundreiz ist lange bekannt. Loos kam übereinstimmend mit anderen Autoren zu der Ansicht, daß die Traumatotaxis nur

als ein Spezialfall der Chemotaxis anzusehen ist. Da beobachtet wurde, daß in mechanisch und chemisch geschädigten Zellen die Kerne völlig verschwinden können (Biechele), schien die Möglichkeit gegeben, daß beim Absterben des Kernes die bei der Kernverlagerung chemotaktisch wirksame Substanz gebildet oder freigesetzt wird.

Bei den folgenden Versuchen wurde nun ausgezählt, in wievielen Zellen der 1. Zellreihe neben der Wundstelle die Kerne nach der der Wundstelle zugekehrten Zellwand verlagert waren, a) wenn der nebenliegende verwundete Zellteil noch einen Kern enthielt und hier also Zerfallsprodukte desselben auftreten und in die beobachtete Zelle eindiffundieren konnten, und b) wenn der verwundete Zellteil keinen Kern enthielt und die oben dargelegte Möglichkeit ausgeschlossen war.

Um eine Diffusion von irgendwelchen Stoffen von der einen verwundeten Zellhälfte in die andere zu verhindern, wurden bei diesen Versuchen die Wunden mit dünnen Glasplättchen angebracht, die während der Versuchsdauer in der Zwiebel stecken blieben.

Die Untersuchungen erfolgten nach 12, 15, 18 und 21 Stunden, da Vorversuche ergaben, daß zuvor keine maximale Kernverlagerung eintritt.

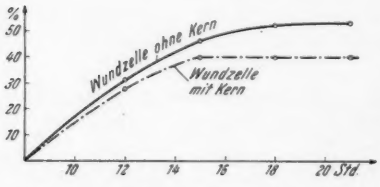


Abb. 2. Prüfung des Einflusses der Kerne von Nachbarzellen auf die Kernverlagerung. Abszisse: Stunden nach dem Wundreiz; Ordinate: Prozentsatz der Zellen mit Kernverlagerung nach der zur Wundstelle gekehrten Zellwand. Die ausgezogene Kurve bezieht sich auf Kernverlagerung in Zellen, deren benachbarter, den Kern chemotaktisch anziehender, verwundeter Zellteil selber keinen Kern mehr enthält. Die gestrichelte Kurve bezieht sich auf entsprechende Zellen, bei denen aber der benachbarte verletzte Zellteil noch einen Kern enthält.

Die bei der Auszählung der Präparate erhaltenen durchschnittlichen Werte gibt die Abb. 2.

Die Versuche zeigen, daß die maximale Kernverlagerung nach 21 Stunden erreicht ist (Ritter gab 18 Stunden an).

Der Kernverlagerung geht also ganz deutlich eine Plasmaverschiebung voraus. Der Kern folgt dieser erst, nachdem sie ihren Höhepunkt längst überschritten hat. Auch diese Tatsache darf als Beweis dafür angesehen werden, daß es sich bei der Verlagerung um eine aktive Bewegung des Kerns handelt und nicht ein Mitführen im Plasma, also eine passive Bewegung, wie Ritter folgert.

Die Versuche lassen weiter erkennen, daß der Kern der verwundeten Zelle an der Bildung des chemotaktisch wirksamen Stoffes nicht wesentlich beteiligt sein kann. Es sieht zunächst eher so aus, als wirke er im Gegenteil hemmend auf die Bildung dieser Stoffe, dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Wundzellen, die noch einen Kern enthalten, durchschnittlich größer sind als diejenigen ohne Kerne, so daß die wirksame Substanz, wenn sie zuerst an der Schnittfläche entsteht, länger braucht, bis sie auf die betreffenden Kerne einwirken kann.

b) Kernverlagerung infolge von Druckreiz

Daß Zerfallsprodukte des Kerns nicht an einer chemotaktischen Anziehung desselben beteiligt sein können, bestätigte außerdem die Beobachtung, daß eine Kernverlagerung auch nach Druck erfolgen kann. Ich wurde darauf aufmerksam, als sich bei einem Versuch in Fortsetzung der Schnittwunde eine Kernansammlung fand. Eine äußerliche Verletzung der Zelle war nicht zu sehen. Das Protoplasma zeigte in der bezeichneten Linie Mikronenbildung.

Bei Wiederholungen des Versuchs wurde festgestellt, daß der Druckreiz bei *Allium cepa* verhältnismäßig stark sein muß, bis die oben beschriebene Wirkung eintritt, bzw. daß bei dem erforderlichen Druck meist schon eine mechanische Verletzung der Zelle eintritt.

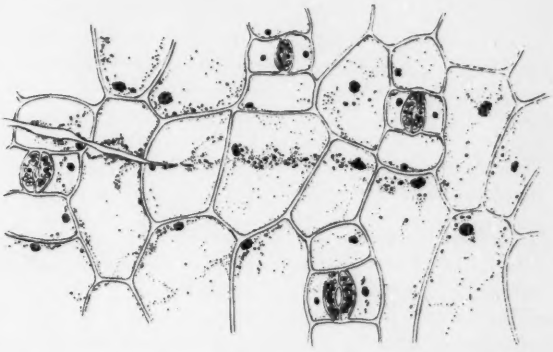


Abb. 3. Wirkung von Druckreiz auf die Epidermis von *Tradescantia zebrina*. Mikronenbildung des Plasmas und Kernverlagerung in den gereizten, teilweise auch in den benachbarten Zellen. Versuchsdauer 18 Std.

Es wurde daher in der Folge noch ein Objekt gesucht, an dem die Reaktion leichter hervorgerufen werden konnte. Dies war bei der Epidermis von *Tradescantia zebrina* der Fall.

Um weitere Wundreize zu vermeiden, wurden die ganzen Blatteile in Fixiergemisch nach Navaschin (10 cm^3 Chromsäure, 1 cm^3 Eisessig, 4 cm^3 40%iges Mendels Formalin) 24 Stunden fixiert und mit fuchsinschwefeliger Säure nach Feulgen gefärbt. Druckstellen wurden mit der stumpfen Querseite einer Rasierklinge angebracht.

Oft schon nach 6 Stunden zeigte sich die veränderte Lage der Kerne auf der Drucklinie. Die Kerne vergrößerten sich meist stark. Das Plasma war in der bezeichneten Linie jeweils deutlich granuliert, Vakuolenbildung dagegen war seltener. Die Kerne der angrenzenden Zellen verlagerten sich häufig noch an die der Druckstelle nächstliegende Wand (Abb. 3).

Die Mikronenbildung des Protoplasmas ist zum Teil reversibel. Sie kann nach einigen Tagen verschwunden sein. Der Kern befindet sich dann meist in der

ursprünglichen Lage. Der chemotaktisch wirksame Stoff ist also mit dem teilungsauslösenden Wundhormon nicht identisch, er könnte höchstens eine Komponente desselben sein.

Starke Vakuolisierung des Plasmas dagegen ist irreversibel. Sie wurde noch nach 8 Tagen beobachtet. Der Kern lag meist noch an der Druckstelle, selten hatte er seine Normallage wieder eingenommen.

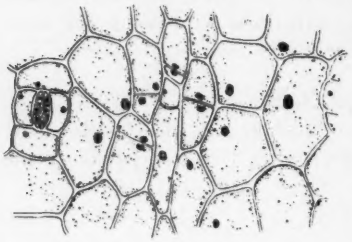


Abb. 4. Wirkung von Druckreiz auf die Epidermis von *Tradescantia zebrina*. Erhöhte Empfindlichkeit der Zellen über den Adern.

Im Gegensatz zu den Kernen der Nebenzellen verlagerten sich die Kerne der langgestreckten Zellen über den Adern des Blattes nach Druckreiz häufiger zur Druckstelle hin als in den normalen Epidermiszellen (Abb. 4).

In Spaltöffnungsnebenzellen erfolgte keine Kernverlagerung. Dieses Verhalten ändert sich nicht, wenn die Pflanzen einige Tage vor und während des Versuches im Dauerlicht oder dauernder Dunkelheit gehalten werden.

c) Die mögliche Einwirkung von Aminosäuren auf die chemotaktische Anziehung der Kerne

Ritter fand, daß Preßsaft von *Allium cepa* auf die Kerne chemotaktische Wirkung ausübt. Da Fitting außerdem feststellte, daß durch Preßsaft Plasmaströmung hervorgerufen werden kann und sich schließlich 1-Methylhistidin als die plasmodinetisch wirksamste Substanz bei *Vallisneria*-Blättern herausstellte, lag die Frage nahe, ob nicht eine beim Plasmazerfall entstehende Aminosäure die chemotaktisch wirksame Substanz sei.

Bei den Vorversuchen mit Blattextrakten, die nach Fitting hergestellt wurden und bei Versuchen, bei denen 1%iges Erythrosin auf die Oberseite der bisher verwendeten Epidermis der Zwiebelschalen von *Allium cepa* aufgetragen wurde, stellte sich heraus, daß die Substanzen nicht oder nur schlecht in die Zellen eindiffundierten. In der Folge wurde daher die Epidermis abgezogen und umgekehrt wieder auf die Zwiebelstücke aufgelegt, dann ein Tropfen der betreffenden Flüssigkeit mit Hilfe einer Pipette aufgetragen und die Objekte wie üblich in einer Petrischale aufbewahrt. Die Substanzen diffundierten jetzt gut ein, wie an den mit Erythrosinlösung behandelten Objekten zu sehen war.

Nun wurden 1%-, 0,5%-, 0,1%-, 0,05%-, 0,01%ige Lösungen von Asparagin, Alanin, Leucin, Histidin hergestellt und je ein Tropfen auf die (wie vorne beschrieben) vorbereiteten Objekte gebracht und diese nach 24 und 48 Std. fixiert und untersucht. Es zeigte sich niemals Kernverlagerung.

Wuchsen dagegen, wie dies manchmal nach 1—2 Tagen der Fall war, Pilzhyphen auf der Epidermis, so war nach diesen Stellen hin eine Kernverlagerung in mehreren Zellreihen zu sehen. Diese kann auf eine Schädigung der Zellunterlage zurückzuführen sein, die sekundär eine Kernverlagerung verursacht, oder aber auf Ausscheidung von Stoffen, die selbst chemotaktisch auf den Kern wirken.

6. Atmungssteigerung

Nachdem der zeitliche Verlauf der Vergrößerung der Kerne, der Nucleoli und der Verlagerung des Plasmas festgestellt war, sollte nun auch der Verlauf der Atmungssteigerung als restituierender Vorgang nach der Verwundung ermittelt werden. Sie wurde an der erhöhten Wärmebildung des verletzten Gewebes gemessen.

Ein Dewargefäß, das sich in einem mit Watte ausgestopften Zinkzylinder befand, wurde mit feuchtem Fließpapier ausgelegt und in das Gefäß etwas Wasser von 23° eingefüllt. Auf eine Schale, die an einem Drahtbügel am Korken des Gefäßes aufgehängt war, wurde eine unverletzte Zwiebel von *Allium cepa* gelegt, die schon ein paar Tage in dem Raum, in dem der Versuch durchgeführt wurde, aufbewahrt worden war, damit sie die Außentemperatur angenommen hatte.

Die Temperatur wurde mit einem Thermoelement aus 2 mm starkem Kupfer-Konstantan-Draht in Verbindung mit einem Spiegel-Galvanometer von Siemens und Halske gemessen. Die beiden Lötstellen wurden durch 2 Glasröhren im Kork in das Gefäß geführt und in die Zwiebel eingestochen. Die Skala des Galvanometers wurde in möglichst großer Entfernung an der Wand angebracht. Nachdem das Gefäß geschlossen und noch einmal isoliert worden war, wurde abgewartet, bis das Galvanometer sich konstant eingestellt hatte. „Die Temperaturmessungen wurden von großen Schwierigkeiten beeinträchtigt", schreibt Drawert, und ich kann dies nur bestätigen. Obwohl die ganze Apparatur sehr gut isoliert und außerdem in einem Dunkel-Konstantraum von 23° im Untergeschoß des Botanischen Instituts aufgestellt war, so daß nur sehr geringe Temperaturschwankungen und Erschütterungen auftraten, war es doch schwierig zu erreichen, daß das Galvanometer keine Schwankungen aufwies.

Zur Ausführung der Verletzung diente ein unten dünn ausgezogenes und verbreitertes Glasstäbchen, das durch den Kork geführt wurde. Dieses wurde, um die Verletzung anzubringen, vorsichtig nach unten geschoben. Dabei stach es ein bis mehrere Millimeter neben der Lötstelle des Thermoelementes in die Zwiebel ein.

Die Abb. 5 zeigt einen typischen Versuchsverlauf. Hier ist die tatsächliche Temperaturerhöhung angegeben. Die Eichung des Galvanometers ergab, daß ein Skalenteil 0,00145° entspricht.

Die Versuche zeigen einen raschen Temperaturanstieg nach der Verwundung, die eigentliche Reiz-Temperaturerhöhung. Ihr folgt teilweise ein gewisser Stillstand oder gar geringer Temperaturrückgang. Auch Drawert fand bei seinen Versuchen zum Teil eine zweigipfelige Kurve. Die Temperaturerhöhung schwankt je nach Entfernung der Wunde vom Thermoelement und Größe der Verletzungsstelle zwischen 0,087 und 0,030°. Auch seitlich ist das Maximum großen Schwankungen unterworfen. Im allgemeinen war es schon nach 10—30 Minuten erreicht; doch zeigte sich ein Fall, in dem das Maximum erst nach 2 Stunden auftrat. Häufig war ein etwas rascheres Abfallen nach Überschreiten des Maximums in der ersten bis zweiten Stunde nach Versuchsbeginn zu verzeichnen, das sich dann verlangsamte und nach etwa 6 Stunden zu einem gewissen Stillstand kam, bzw. von da ab sogar einige Zeit einen geringen Anstieg zeigte.

Zum Vergleich wurde bei einigen Versuchen die Verwundung am Objekt nach Einstellung des Galvanometers auf den Nullpunkt dadurch hervorge-

rufen, daß eine Lötstelle des Thermoelements, die in eine Glasröhre eingeführt war, etwas tiefer in die Zwiebel eingedrückt wurde. In keinem Falle erhielt ich hier eine Kurve mit zwei Maxima. Es überlagert daher die auftretende Reibung und die Atmungssteigerung die Verdunstungskälte, die hier auch dadurch, daß die Wunde sehr klein ist und Flüssigkeit kaum austreten kann, wohl gering ist. Die Temperaturerhöhung überstieg 0,04° nicht. Der sehr langsame Temperaturrückgang nach einigen Stunden war ebenfalls festzustellen.

Die Abb. 5 zeigt, daß sofort nach Verwundung ein rascher Temperaturanstieg der Gewebe einsetzt. Gleichzeitig nimmt die Größe der Kerne etwas ab, nicht aber die der Nucleoli. Die Temperaturerhöhung und die damit verbundene Atmungssteigerung führen zu den ersten Restitutionsvorgängen in

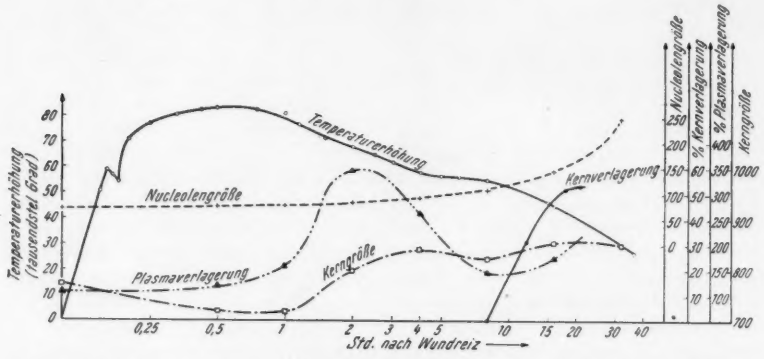


Abb. 5. Darstellung des zeitlichen Zusammenhanges der nach einem Wundreiz auftretenden Veränderungen. Abszisse: Stunden nach dem Wundreiz. Ordinate: 1. Temperaturerhöhung in tausendstel Grad. Ordinate links: 2. Plasmaverlagerung, angegeben ist der Unterschied (in %) der Plasmadichten an den Zellpolen der an den Wundrand angrenzenden unverletzten Zellen. 3. Relative Kerngröße. 4. Relative Größe der Nucleoli. 5. Prozentsatz der zur Wundstelle verlagerten Kerne.

der Zelle. Danach kann nun auch die Vergrößerung der Kerne einsetzen, zunächst bis zur Normalgröße, dann aber noch darüber hinausgehend. Gleichzeitig ist die starke Plasmaverdichtung in den unverletzten Zellen zu bemerken. Das Maximum der Atmung ist überschritten, die Atmung jedoch noch erhöht. Daher kann die Plasmavermehrung an den der Wundstelle zugekehrten Zellenden nicht mit den ersten Restitutionsvorgängen der Zellen im Zusammenhang stehen. Da es sich zunächst einwandfrei um eine Plasmaverlagerung innerhalb der Zelle handelt, könnte man an eine Verschiebung aus physikalischen Gründen denken. Der Turgor der Zellen verändert sich durch die Verletzung der Nebenzellen, und so könnte das Plasma aus diesem Grunde in der entsprechenden Richtung verlagert werden. Gegen diese Ansicht spricht die Tatsache, daß nach der Verletzung der Zellen eine erhöhte Plasmaströmung in den Nebenzellen zu beobachten ist, die durchaus nicht hauptsächlich zur Wundstelle hinführt. Daher darf wohl angenommen

werden, daß die Plasmaansammlung ebenso wie die Vergrößerung der Kerne, sowie die etwas später erfolgende Vergrößerung der Nucleoli auf Restitutionsvorgänge zurückzuführen sind, die den eigentlichen Wundverschluß einleiten. Auffallend ist außerdem, daß ein gewisser Stillstand des Temperaturabfalles etwa 4—8 Std. nach dem Wundreiz mit dem Beginn des starken Zuwachses der Nucleoli zusammenfällt. Dieser scheint also mit erhöhter Aktivität der Zellen verbunden zu sein.

Eine Zunahme der Nucleoli zur Zeit der stärksten Plasmaansammlung am Zellende hat noch kaum stattgefunden. Es ist daher nicht zu erwarten, daß schon Plasmaneubildung einsetzte. Da bekannt ist, daß Nucleolengröße und Synthese des cytoplasmatischen Eiweißes in engem Zusammenhang stehen, ist vielmehr erst nach der starken Vergrößerung der Nucleoli, die gleichzeitig eine relative zur Kerngröße ist und der Verlagerung der Kerne nach dem Zellende Plasmaneubildung anzunehmen. Nach Zaleski und Kovchoff setzt die Eiweißvermehrung erst nach zwei Tagen ein, und durch Farbreaktionen ist keine Neubildung von Plasma am Zellende in der Nähe des Kernes nachzuweisen, deshalb kann nichts darüber ausgesagt werden, ob die Plasmaneubildung nur in der Nähe des Kernes oder auch räumlich von diesem entfernt erfolgen kann. Bestimmt ist aber, daß die Bewegung des Kernes zur Wundstelle hin eine aktive ist, denn sie erfolgt erst, wenn das Maximum der Plasmaansammlung lange überschritten ist. Welches der chemotaktisch wirksame Stoff ist, bleibt unbestimmt. Es kann sich jedoch nicht um Zerfallsprodukte des Kernes oder das teilungsauslösende Wundhormon handeln, da die Kernverlagerung auch nach Druckreiz erfolgt.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Nach Verwundung der Epidermis von *Allium cepa* zeigt sich zunächst eine Größenabnahme der Kerne am Wundrand. Danach nehmen die Kerne an Größe zu.

2. Die Nucleolusvolumina vergrößern sich ebenfalls in der Wundzone. Die Vergrößerung ist relativ bedeutend stärker als bei den Kernen und setzt erst später ein.

3. Die Plasmavermehrung an der der Wundstelle zugekehrten Seite beruht auf einer Plasmaverschiebung, hauptsächlich vom entgegengesetzten Zellende her.

4. Die Wanderung der Kerne zur Wundstelle hin ist aktiv; sie erfolgt erst, wenn die Plasmaverschiebung schon im Abklingen ist.

5. Stoffe, die beim Absterben und beim Zerfall der Kerne verwundeter Zellen frei werden, üben keinen chemotaktischen Reiz auf die Kerne der Nebenzellen aus. Verschiedene Aminosäuren sind chemotaktisch ebenfalls nicht wirksam. Der chemotaktisch wirksame Stoff ist mit dem teilungsauslösenden Wundhormon nicht identisch, sondern könnte höchstens eine Komponente desselben sein.

6. Auch nach mechanisch-traumatischem Reiz durch Druck erfolgt eine Kernverlagerung. Die Reizschwelle ist bei verschiedenen Objekten verschieden hoch.

7. Die Spaltöffnungsnebenzellen und die Epidermiszellen über den Adern zeigen ein von den übrigen Epidermiszellen verschiedenes Verhalten bei der Traumatotaxis. Die Spaltöffnungsnebenzellen sind bei *Tradescantia zebrina* auch nach längerer Verdunklung oder Dauerbelichtung unempfindlicher als die übrigen Epidermiszellen, während die über den Adern umgekehrt erhöhte Empfindlichkeit aufweisen.

8. Die Temperaturerhöhung nach Verwundung beträgt je nach Art der Wunde 0,04—0,087°. Die zeitliche Lage ihres Maximums schwankt ebenfalls stark, meist aber wird sie innerhalb 30 Minuten nach dem Wundreiz erreicht.

Für die Anregung zu diesen Untersuchungen bin ich Herrn Prof. Dr. Erwin Bünning sehr zu Dank verbunden.

Literatur

Biechele, O., 1932: Beiträge zur Kenntnis von Kern und Plasma. Diss. d. Techn. Hochschule München.

Caspersson, T., 1950: Cell growth and cell function. New York.

Drawert, H., 1937: Untersuchungen über den Erregungs- und Erholungsvorgang in pflanzlichen Geweben nach elektrischer und mechanischer Reizung. Planta *26*, 391.

Fitting, H., 1938: Über die Auslösung von Protoplasmaströmung bei *Vallisneria* durch einige Histidinverbindungen. Jb. wiss. Bot. *82*, 613.

Hettlinger, M. A., 1901: Influence des blessures sur la formation des matières protéique dans les plantes. Revue de Bot. *13*, 248.

Kovchoff, J., 1903: Über den Einfluß von Verwundungen auf Nucleoproteide in den Pflanzen. Ber. dtsch. Bot. Ges. *XXI*, 165.

Loos, W., 1931: Zur Kenntnis der Wundreaktionen des pflanzlichen Zellkerns. Protoplasma *14*, 331.

Miehe, H., 1901: Über die Wanderung des pflanzlichen Kerns. Flora *88*, 105.

Nestler, A., 1898: Über die durch Wundreiz bewirkten Bewegungserscheinungen des Zellkerns und des Protoplasmas. Sitzungsber. d. k. Akad. d. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. *107*, Abt. I, 708.

Pätau, K., 1943: Zur statistischen Beurteilung von Meßreihen. Biol. Zbl. *63*, 152.

Ritter, G., 1911: Über Traumatotaxis und Chemotaxis des Zellkerns. Z. Bot. *3*, 1.

Stich, H., 1951: Experimentelle karyologische und cytochemische Untersuchungen an *Acetabularia mediterranea*. Z. Naturf. *6 b*, Heft 6, 319.

Tangl, E., 1884: Von der Lehre der Kontinuität des Protoplasmas in Pflanzengeweben. Sitzungsber. d. k. Akad. d. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. *90*, Abt. I, 10.

Zaleski, W., 1901: Beiträge zur Kenntnis der Eiweißbildung in den Pflanzen. Ber. dtsch. Bot. Ges. *XXI*, 331.

Kurze Mitteilungen

Der Kapillarheber, ein Bauelement zur Herstellung von Durchströmungspräparaten

Von

A. Rieth und **H. A. v. Stosch**

Aus dem Institut für Kulturpflanzen-Forschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften in Gatersleben und dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

Mit 1 Textabbildung

(Eingelangt am 3. Mai 1954)

Der Versuch, das alte Verfahren des kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Flüssigkeitswechsels in mikroskopischen Präparaten durch Absaugen mit Filtrierpapier zu verbessern, ergab im Kapillarheber ein einfaches Mittel, überschüssige Flüssigkeit, und nur diese, unter dem Deckglas zu

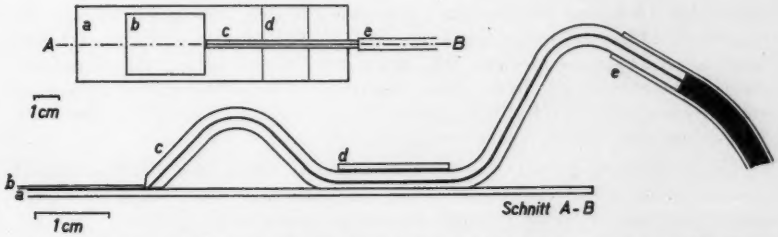


Abb. 1. Aufriß und Durchschnitt eines auf den Objektträger montierten Kapillarhebers. *a* Objektträger, *b* Deckglas, *c* Kapillarheber, *d* Sicherung des Hebers durch übergeklebten Papierstreifen, *e* ableitender Gummischlauch.

entfernen und damit den Flüssigkeitsstrom im Präparat nur von der Größe des Zulaufs abhängig zu machen. Mit seiner Hilfe lassen sich daher einfache Durchströmungsanordnungen aufbauen, die die Abmessungen gewöhnlicher Präparate haben und damit keine zusätzlichen Anforderungen an den Strahlengang des Mikroskops stellen, also auch stärkste Systeme und jegliche Art von Beleuchtung gestatten.

Ein Kapillarrohr von etwa 0,2 mm lichter Weite und 3 mm äußerem Durchmesser (Thermometerkapillare) wird gemäß Abb. 1 gebogen und zugeschliffen. Der Planschliff am geraden Mittelstück und an der Mündung des kurzen Schenkels sollen in einer, zur Symmetrie-Ebene des Hebers senkrechten Ebene liegen, die Fläche an der Stirnseite mit dieser einen Winkel von etwa 70 bis 80° und ebenfalls einen rechten Winkel mit der Symmetrie-Ebene bilden. Der Heber wird an der Abflachung des geraden Mittelstücks so auf das Ende eines Objektträgers gekittet, daß die Mündung seines kurzen Schenkels in die Nähe der Objektträgermitte kommt und der Glasoberfläche möglichst dicht anliegt. Der verbleibende Spalt soll niedriger sein als die Flüssigkeitsschicht unter dem Deckglas des endgültigen Präparats. Der freie Schenkel des Hebers wird mit einem Stück Ventilgummischlauch verlängert.

Füllt man Heber und Schlauch völlig mit Wasser, so wird seine durch den Niveau-Unterschied zwischen Mündung des kurzen Schenkels und Ende des Gummischlauchs bestimmte „Saugkraft" nach oben durch die Spannung der Menisken zwischen Heberende und Objektträger begrenzt. Unterhalb dieser Grenze wirkt die Hebermündung als Ventil gegen das Eindringen von Luft, die den Heber außer Tätigkeit setzen würde. Schiebt man das Deckglas eines Wasserpräparats an die Hebermündung so, daß es dem Anschliff an dessen Stirnseite anliegt, dann werden nun die Menisken am Deckglasrand den im Gesamtsystem möglichen Unterdruck bestimmen, vorausgesetzt, daß die oben angeführte Bedingung erfüllt wurde. Dieser liegt, um orientierende Werte zu geben, nach rohen Versuchen für Leitungswasser und 0,23 mm Abstand zwischen Objektträger und Deckglas bei 30 mm, für Präparate von 0,035 mm Dicke bei 210 mm Wassersäule. Hebt man also das Schlauchende so weit, daß diese Werte nicht erreicht werden, so ersetzt sich der Flüssigkeitsverlust durch die Verdunstung an den Deckglasrändern aus dem Heber, andererseits werden der Hebermündung gegenüber am Deckglasrand aufgebrachte Wassertropfen durch die Spannung im System unter das Deckglas gesaugt und gegenüber durch den Heber abgeleitet. Dauernde Durchströmung des Präparats ist bei jeder Größe eines kontinuierlichen Zustroms möglich, die unter der Förderleistung der Kombination Präparat + Heber liegt. Diese Leistung ist bei dünnen Präparaten im wesentlichen von der Reibung unter dem Deckglas, bei dicken durch die Förderung des Hebers selbst bestimmt.

Praktisch wird es oft zweckmäßig sein, die Dicke des Präparats nach unten hin durch untergelegte Glasfäden u. dgl., nach oben durch Anvaselinieren der beiden freien Deckglaskanten zu begrenzen.

Der Nachteil der ungleichmäßigen Durchströmung des Präparats, deren Geschwindigkeit am größten in der Nähe der Verbindungslinie zwischen Zulauf und Ablauf sein wird und mit steigender Entfernung von ihr abnimmt, dürfte meist nicht sehr stören. Durch Einschalten schmaler Streifen von saugfähigem Filtrierpapier zwischen Deckglas und Heber bzw. Deckglas und Zufluß läßt er sich, wenn nötig, weitgehend vermeiden.

Für kontinuierlichen Durchfluß lassen sich als Zuführungsleitungen in einfachster Weise Heber mit einem kapillar und so fein ausgezogenen Schenkel verwenden, daß er biegsam wird und seine Mündung an die freie Deckglaskante angelegt werden kann. Die Zuflußgeschwindigkeit läßt sich

dann in gewissen Grenzen durch Heben und Senken des Vorratsgefäßes für die Untersuchungsflüssigkeit regeln.

Ungeeignet ist die Methode für kleine Einzelobjekte, die sich unter dem Deckglas nicht festlegen lassen und durch den Wasserstrom im Präparat abgeschwemmt werden.

Zusammenfassung

Der Kapillarheber übernimmt die Rolle des Filtrierpapiers beim Durchsaugen von Flüssigkeit durch ein Deckglaspräparat, hat aber nicht dessen Nachteil, zu viel abzusaugen, und ist daher auch für die Einrichtung kontinuierlich durchströmter Präparate geeignet.

Eine Kammer für mikroskopische Lebenduntersuchungen mit Trennung von Objekt und strömendem Medium

Von

Hans Adolf von Stosch

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

Mit 2 Textabbildungen

(Eingelangt am 3. Mai 1954)

In der vorangehenden Mitteilung wurde eine für langdauernde Lebendbeobachtungen geeignete Anordnung, bei der das Objekt direkt im Durchstrom liegt, beschrieben. Das bringt den Nachteil, daß nicht attachierte, einzellige Objekte abgetrieben werden. Für solche wurde die nachfolgend beschriebene Kammer entwickelt, in der Durchstrom und Objekt durch eine

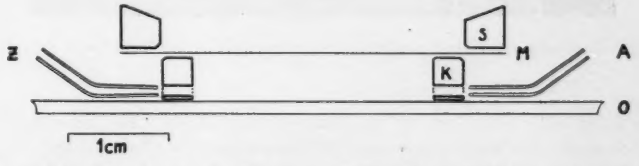


Abb. 1. Durchschnitt durch die Kammer. *S* Spannring, *K* Kammerring, *Z* Zufluß, *A* Abfluß, *M* Membran, *O* Objektträger.

permeable Membran getrennt sind, die das Abdiffundieren störender Stoffwechselprodukte vom und den Zustrom der Nährstoffe zum Objekt gestattet, ohne es den Strömungen der durchfließenden Lösung auszusetzen.

Aufbauprinzip: Eine mittels zweier übereinandergreifender Ringe aus Plexiglas gespannte Cellophanmembran wird durch Bohrungen des engeren, auf einen Objektträger gekitteten Ringes von unten her mit Flüssigkeit bespült. Auf sie wird das Objekt in einem Tropfen Untersuchungsmedium gebracht und normal mit dem Deckglas bedeckt.

Herstellung der Kammer: Wir wählten zwei Plexiglasrohre (Maße siehe Zeichnung) aus, die sich mit etwa 0,15 mm Spiel ineinanderschieben ließen. Aus diesen wurden Zylinderringe von 4 mm Höhe gedreht (Abb. 1). Der kleinere von ihnen, der Kammerring, erhielt möglichst nahe der unteren Fläche zwei einander gegenüberliegende Bohrungen von 1 mm Weite, die Zu- und Abfluß vermitteln sollen. Seine obere, äußere Kante wurde zur Schonung der Membran sorgfältig gerundet, die benachbarte innere ebenfalls gebrochen. Die untere, innere Kante des weiteren Spannringes wurde gerundet; oben kann er, wie aus der Abbildung zu ersehen, konisch ausgedreht werden, um den Objektiven größere Randfreiheit zu geben. Zum Montieren der Kammer in den angegebenen Maßen ist ein Objektträger von 30 × 75 mm notwendig. Als Anschlußstutzen für die Zufluß-

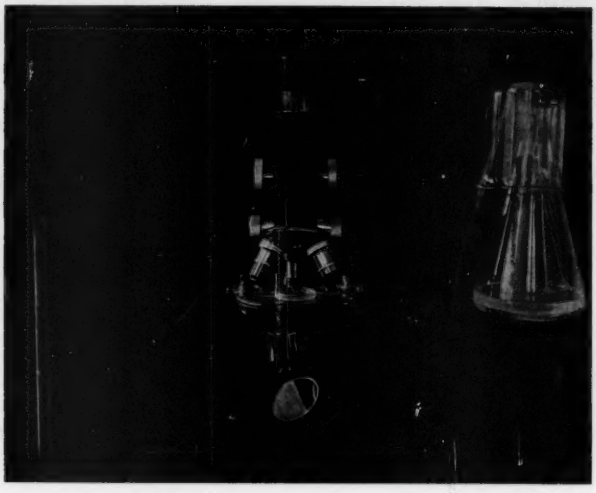


Abb. 2. Anordnung der Durchströmungskammer auf dem Objekttisch mit Zu- und Abfluß.

leitung wird ein etwas konisch gezogenes Glasröhrchen mit seinem dünnen Ende von außen so weit in die eine Bohrung hinein und eventuell durch die gegenüberliegende Bohrung hindurchgeschoben, bis es festsitzt. Dann wird es innen an der Eintrittsstelle angeritzt, nach dem Herausnehmen hier abgebrochen und schließlich noch mit einem leichten Knie versehen. Endgültig dreht man es dann nur fest in die Bohrung ein. Der Abflußstutzen wird ebenso hergestellt.

Montage und Betrieb der Kammer: Aus einem Bogen gewöhnlichen Cellophans von 0,02 bis 0,03 mm Dicke werden mit dem äußeren Umfang des Spannrings als Lehre unter Benutzung einer Beschneidefeder Kreisscheiben hergestellt. Diese kocht man in Wasser aus und überträgt sie in die zum Durchströmen vorgesehene Flüssigkeit. Ein Kammerring wird auf eine ebene Unterlage gelegt, das feuchte Cellophanscheibchen zentrisch darauf gebracht und nun der Spannring mit kräftigem Druck so weit über

den Kammerring geschoben, bis die Membran fest und völlig glatt eingespannt ist. Darauf werden die Ringe umgedreht, die zwischen Kammer und Spannring hervorstehenden Ränder der Membran entlang der unteren Fläche des weiteren Ringes mit einer Rasierklinge abgeschnitten, die beiden Anschlußstücke in die Bohrungen eingedreht und die untere, jetzt nach oben gekehrte Fläche des Kammerringes mit flüssig gemachtem zähem Ramsayfett bestrichen. Darauf kehrt man die Kammer um und füllt in den oberen von Membran und Spannring begrenzten Raum etwas Wasser, um das Austrocknen der Membran zu verhindern, setzt die Anordnung nun auf den zugehörigen Objektträger und kittet sie durch vorsichtiges Erwärmen mit einer Flamme auf. Dann wird das auf der Membran stehende Wasser entfernt.

Als Vorratsgefäß wählten wir ein Erlenmeyer-Kölbchen von 200 bis 300 cm^3 Inhalt und füllten es einige Zentimeter hoch. Die Entnahme der Lösung geschah durch einen Glasheber, an den nach schlechten Erfahrungen mit ganz aus Gummi bestehenden Leitungen (Giftwirkungen der Gummiteile), Glasröhrchen mit kurzen Gummiverbindungen angeschlossen und zum Zuflußstutzen der Kammer geführt wurden. In Abb. 2, die die Anordnung der Kammer mit Zu- und Abflüssen zeigt, sind der Übersichtlichkeit wegen nur Gummileitungen verwendet worden. Als Gummischlauch für diese und für die Abflußleitung wurde durchsichtiger Ventilgummi, wie für Fahrradventile verwendet, benützt, der vorher durch Füllen und Auskneten mit einem Netzmittel von Talkum befreit war.

Die Leitungen werden nun angeschlossen, das Vorratsgefäß auf etwa 300—400 mm über die Höhe des Objekttisches des Mikroskops gebracht, die Kammer so gehalten, daß der Abflußstutzen nach oben zeigt, und durch Saugen am Ende der Abflußleitung der Heber in Tätigkeit gebracht. Nach Füllung der Kammer in dieser oder den Leitungen zurückbleibende Luftblasen müssen durch schärferes Saugen entfernt werden. Man spannt nun den die Kammer tragenden Objektträger in den Objektführungsapparat des Mikroskops und senkt das Vorratsgefäß. Die Membranoberfläche in dieser Lage bildet das Bezugsniveau unserer weiteren Beschreibung. Die Membran der Kammer, und darin liegt die größte Schwierigkeit in deren Anwendung, stellt ein empfindliches Manometer für Druckschwankungen im System dar. Schon das Abtropfen der Lösung aus dem Ende der Abflußleitung ruft störende rhythmische Durchbiegungen der Membran hervor. Wir schoben das Ende des ableitenden Gummischlauchs daher über ein spazierstockförmig gekrümmtes Röhrchen und hängten dieses in ein vertikal eingespanntes Glasrohr von 8 mm Weite ein, dessen Wand seine Mündung anliegt. Um die Membran frei von vertikal angreifenden Kräften zu machen, müssen — gleiche Reibungsgrößen in den Leitungen vorausgesetzt — Oberfläche der Lösung im Vorratsgefäß und Ende der Abflußleitung gleiche Höhendifferenzen zum Nullniveau bekommen. Die dadurch erreichte Ebnung der Membran kann man an den Spiegelbildern etwa der Fenster des Laboratoriums an ihrer Oberfläche überprüfen. Als Betriebsdruck fanden wir den durch eine Höhendifferenz von 5 mm zwischen Vorratsflüssigkeit und Membran erzeugten für unsere Zwecke ausreichend. Er ergab einen Durchfluß von 10 bis 20 cm^3/Stunde. Um den Niveauverlust im Vorratsgefäß auszugleichen wurde die abfließende Flüssigkeit in einem Meßzylinder aufgefangen und von Zeit zu Zeit ein entsprechendes Volumen

frischer Durchströmungslösung in das Vorratsgefäß nachgefüllt. Die dadurch erzeugte leichte Verschiebung in der Lage der Membran war für unsere Beobachtungen ohne Einfluß. Wo sie eine Rolle spielt, müßte man entweder ein Gefäß mit großer Bodenfläche, z. B. einen Fernbachkolben, verwenden oder zu einer Niveau-Vorrichtung greifen. Als solche kommt, da ja Druckschwankungen vermieden werden sollen, wohl allein ein Überlaufsniveau, wie es an Wasserbädern angebracht wird, in Frage.

Ist der Durchfluß eingeregelt, so wischt man die Reste flüssigen Wassers mit einem Viscoseschwämmchen von der Membran. Die Anordnung kann nun mit dem Objekt beschickt werden. Zweckmäßiger läßt man sie aber, besonders bei der ersten Inbetriebnahme, einige Stunden laufen, um sie sauber zu spülen. Schließlich wird die das Objekt enthaltende Flüssigkeit in entsprechender Menge auf die Membran gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Dieses kann nötigenfalls mit Glasfäden u. dgl. abgestützt werden. Beliebige Systeme bis etwa zur Wasserimmersion 90fach num. Ap. 1,20 von Leitz sind benützbar. Zur Beleuchtung eignet sich der achromatische Kondensor num. Ap. 1,4 von Leitz nach Entfernung der Frontlinse. Die Hinterglieder ergeben (nach freundlicher Auskunft der Firma Leitz) eine num. Ap. von 0,7, was genügt, um die erwähnte Wasserimmersion bei Phasenobjekten voll zur Geltung zu bringen.

Mit dieser Anordnung führten wir im Herbst 1952 in List auf Sylt Lebendbeobachtungen der Entwicklung zentrischer Meeresdiatomeen durch. Die Objekte stammten aus Kulturen oder wurden dem Plankton entnommen. Als Durchströmungslösung fand mit etwas „Erd-Schreiber" versetztes Seewasser (1 : 10 bis 1 : 20) Verwendung. Dabei trat im feuchten Seeklima keine störende Konzentrierung der Lösung am Deckglasrande ein. Im Binnenland ist es nötig, für einen Verdunstungsschutz durch Abdecken des Spannringes mit einer für den Durchtritt des Objektivs gebohrten Platte aus Glas oder Kunststoff zu sorgen oder das Deckglas auf der Membran anzuvaselinieren. Nach Überwindung der Anfangsschwierigkeiten konnte die vegetative und sexuelle Entwicklung von zentrischen Diatomeen, wie *Biddulphia mobiliensis*, *Lithodesmium* und *Melosira moniliformis* in bis über 24 Stunden dauernden Beobachtungsreihen verfolgt werden. Von Süßwasseralgen ließen sich *Synura* und *Dinobryon* 24 Stunden am Leben erhalten.

Durch entsprechende Abänderungen des Zuflußsystems ist es zweifellos möglich, die Kammer auch zu langdauernden Versuchen über den Einfluß von Reagenzien auf das lebende Objekt zu verwenden. Außerdem dürfte, etwa durch Einschalten einer temperierten Schlange in die Zuflußleitung bei erhöhtem Durchstrom, auch die Beherrschung der Temperatur im Präparat möglich sein.

Zusammenfassung

Die beschriebene Durchströmungskammer arbeitet mit einer zwischen zwei Plexiglasringe eingespannten Cellophanmembran, die zur hydrodynamischen Trennung, aber osmotischen Verbindung von Objekt und durchfließender Lösung dient. Sie erlaubt ungestörte, langdauernde Lebendbeobachtungen kleiner Objekte selbst bei der Verwendung stärkster Wasserimmersionen.

Numerical Aspects of Protein Molecules in *Escherichia coli*

By

O. L. Sponsler[1] and **Jean D. Bath**[2]

Department of Botany
University of California, Los Angeles

(Received May 5, 1954)

The question sometimes arises among microbiologists concerning the number of protein molecules in a single bacterium. Data are now available which make such computations for *Escherichia coli*, for example, relatively simple. A single *E. coli* organism is essentially a cylindrical rod-like structure of about 2 μ in length and 0.5 μ in cross-sectional diameter. The volume of such a bacterium would be approximately 0.392 cubic microns; or since 1 cubic centimeter is equal to 1×10^{12} cubic microns, the volume of one bacterium would be 0.392×10^{-12} cubic centimeters. The next step is to obtain the weight of this bacterium. We can then obtain the weight of the protein which it contains and hence the number of protein molecules of a certain arbitrary size. The density of fresh *E. coli* has been shown experimentally to be 1.09 (Ruffilli 1933). Using this value and the volume of 0.392×10^{-12} cubic centimeters the computed weight of a single bacterium thus becomes 0.427×10^{-12} gms. Of this roughly 15% (Porter 1946) or 0.064×10^{-12} gms. is protein.

We can now estimate the total number of protein molecules in one bacterium. The proteins of the bacterial protoplasm will undoubtedly differ in molecular weights, but for the sake of ease of computation, let us assume that the proteins all have an arbitrary molecular weight of 36,000 gms. Using Avogadro's number, we know that 36,000 gms. of protein would consist of 6.03×10^{23} molecules, and hence 0.064×10^{-12} gms. of protein would contain 1,070,000 protein molecules. This is, of course, not to be regarded as a precise figure but simply as an indication of order of magnitude. A protein molecule of the molecular weight taken here would consist of about 300 amino acid residues and a total chain length of about 1000 Å. If not completely extended but folded into a cube, but not hydrated, it could form a cube of roughly 35–40 Å on an edge. If hydrated, as it quite probably would be in the bacterial protoplasm, it could be more nearly a cube 50 Å on an edge.

We thus have the picture of a bacterial body $0.5 \mu \times 2 \mu$ which contains approximately 1,070,000 protein molecules associated intimately into molecular and micellar patterns with the smaller molecules of lipids, nucleic acids and carbohydrates, and these in turn interspersed with water molecules and inorganic ions. Such a structure is considerably more complex than the Tobacco Mosaic virus, for example, which on the basis of similar computations can be shown to contain only about 600 protein molecules

[1] Deceased March 14, 1953.

[2] Also of the Department of Biophysics, School of Medicine.

of comparable size. For the sake of easier visualization if we enlarge the bacterial cell, just mentioned, to a scale of 1 micron equal to 10 feet the bacterium would correspond to a cylinder of about 20 feet by 5 feet, the protein molecules, if globular, would be about 6 inches or the size of large grapefruits, and the water molecules about 0.4 inches or the size of small seeds.

It would be of considerable interest to know the quantitative distribution of this 1,070,000 protein molecules between the cell membrane, the heredity mechanisms, other enzyme complexes, etc.; also to know what proportion of these molecules are metabolically active at any instant and what proportion form only inert framework materials. The question also arises as to how many different and distinct protein species are present, and how many individuals there are of each species; that is, are there 100 protein species and 1000 individuals of each species or 2000 protein species and varying numbers of individuals of each species, etc? As a matter of fact, we do not know that the bacterial protoplasm builds protein molecular species at all, but perhaps only more bacterial protoplasm. Assuming for the moment, however, that it does build protein molecules which it in turn fits with other molecules into micellar mechanisms, it must do so at a very rapid rate. If the generation time from one adult bacterium to another is 25 minutes and each daughter cell on fission receives one-half or 535,000 protein molecules, then at some time in the 25 minutes between adults an over-all number of 535,000 protein molecules must have been synthesized. Assuming a uniform rate this would amount to 21,400 protein molecules per minute!

Bibliography

Ruffilli, D., 1933: Biochem. Zeit. *263*, 63.
Porter, J. R., 1946: Bacterial Chemistry and Physiology, Wiley.

Über die Eignung zelleigener Anthocyane zur pH-Wert-Bestimmung des Zellsaftes

Von

Horst Drawert

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

(Eingelangt am 7. Mai 1954)

Für das Verständnis vieler zellphysiologischer Vorgänge ist die Kenntnis der Wasserstoffionenkonzentration des Zellsaftes eine Voraussetzung. Es hat deshalb in der vergangenen Zeit nicht an zahlreichen Versuchen gemangelt, um den pH-Wert des Zellsaftes mit verschiedenen Methoden zu bestimmen. Unter ihnen nimmt das zelleigene Anthocyan mit seinen Indikatoreigenschaften einen breiten Raum ein. Sehr wahrscheinlich liegen die Anthocyane, z. B. das Cyanin im sauren Bereich als rotes Oxoniumsalz und im alkalischen Bereich etwa als blaues Kaliumsalz, vor. Dazwischen können

wir in vitro durch Abstufung des pH-Wertes eines Anthocyanextraktes alle Farbnuancen von Rot über Violett nach Blau herstellen. Vergleicht man den Farbton eines Blumenblattes mit einer auf diese Weise hergestellten Farbskala, dann kann man den pH-Wert des Zellsaftes bestimmen. Folgende Zitate belegen, daß diese Meinung auch heute noch von vielen Autoren vertreten wird.

Cholnoky (1950, S. 117) schreibt: „Ein in dieser Hinsicht vortreffliches Material habe ich in den Epidermiszellen der Blütenblattunterseite von *Senecio cruentus* DC. (‚Cineraria' der Gärtner) gefunden, wo man nach der allgemein geltenden Auffassung in roten Zellen eine niedrige, in blauen dagegen eine hohe (höhere) pH in den Vakuolen erwarten konnte", und Bethe (1952, S. 127) führt aus: „Die Tatsache, daß es Pflanzenzellen mit saurer Reaktion gibt, ist unbestritten; zeigt es uns doch die Beobachtung unmittelbar und ohne experimentelle Eingriffe an Zellen, welche schon von Natur einen Indikator in sich bergen. Der häufigste Blütenfarbstoff ist das Anthocyan (Willstätter), das bei saurer Reaktion leuchtend rot, bei neutraler oder alkalischer Reaktion aber tief blau ist. Den Farbstoff der roten Rose und der blauen Kornblume fand Willstätter (1914) als identisch, und Rohde (1917) fand an Preßsäften das pH der roten Rose zu ungefähr 3,5, das der Kornblume zu ungefähr 7,2." Vgl. ebenfalls Küster (1951, S. 492).

Hier muß darauf hingewiesen werden, daß wir heute zu so allgemeinen Schlußfolgerungen aus dem Farbton des zelleigenen Anthocyans über die Reaktion des Zellsaftes nicht mehr in der Lage sind. Besonders durch die Untersuchungen von Buxton und Darbishire (1929) sowie Smith (1933) wissen wir, daß es eine ganze Reihe von Pflanzen gibt, deren Anthocyane selbst im stark alkalischen Bereich nicht nach Blau umschlagen. Ferner müssen wir mit G. M. Robinson (1939) annehmen, daß der Farbton eines Blumenblattes nicht nur durch den pH-Wert des Zellsaftes bestimmt wird, sondern daß darauf noch eine Anzahl anderer Faktoren einen Einfluß hat; dazu gehören: Art und Konzentration des Anthocyans, das Verhältnis von Anthocyankonzentration zur Konzentration der Co-Pigmente aus der Tannin- und Flavonolgruppe sowie die Assoziation mit Zellsaftkolloiden — wahrscheinlich Polysacchariden —, die bei vielen Anthocyanen eine Farbtonänderung hervorruft. Besonders dem letzten Faktor scheint bei dem Zustandekommen der blauen Farbtöne in den Blumenblättern eine besondere Bedeutung zuzukommen. Entgegen den Angaben von Rohde (1917) stellte R. Robinson (1933) mit der Glaselektrode am Preßsaft der blauen Petalen der Kornblume einen pH-Wert von 4,9 fest. Das Cyanin-Anion muß also in der Zelle durch die Adsorption an ein Zellsaftkolloid stabilisiert werden, so daß es auch bei saurer Reaktion der wässerigen Phase den blauen Farbton beibehält.

Es sei darauf hingewiesen, daß bereits Atkins (1922/23) bei den blauen und roten Blüten von *Hydrangea* aufmerksam machte, daß hier die verschiedenen Farbtöne nicht auf Indikatoreigenschaften des Anthocyans zurückzuführen sind, da beide Blütenarten in seinen Versuchen einen Preßsaft-pH-Wert von 4,0 bis 4,2 aufwiesen. Ferner schloß schon Kraus (1884) aus Titrationsbestimmungen, daß auch blauen Blüten eine saure Gesamtreaktion zukäme.

Von Smith (1933) besitzen wir Angaben über die pH-Werte des Zellsaftes verschiedener Farbspielarten von *Cineraria hybrida hort.* (= *Senecio cruentus*), geschlossen aus den Farbtönen der zelleigenen Anthocyane. Smith kommt zu pH-Werten von 6,2 bis 7,4. Es war nun von Interesse, im Zusammenhang mit den Befunden von Robinson und dem erwähnten Zitat von Cholnoky, diese pH-Werte an Preßsäften elektrometrisch nachzuprüfen.

Dazu wurden die Petalen der Strahlenblüten roter und blauer Cinerarien eingefroren und im gefrorenen Zustand zerstoßen. Sofort nach dem Auftauen erfolgte die Messung des pH-Wertes am abfiltrierten, unverdünnten Saft mit einer Mikroglaselektrode. Ein anderer Teil wurde mit Salzsäure bzw. mit Phosphatpuffergemischen versetzt und so entsprechend dem Vorgange von Smith in Reagenzgläsern eine Farbskala des Anthocyans hergestellt.

Zunächst konnte die Beobachtung von Smith bestätigt werden, daß die aus roten Blüten gewonnene Anthocyanlösung nie nach Blau umschlägt. Die durch pH-Änderung erhaltene Farbskala entsprach völlig der von Smith auf Tafel V, Reihe 2 unter den ‚Red' anthocyanins für *Cineraria*, brick angeführten unbeträchtlichen Farbabstufungen von Rot nach Braunrot. Das aus blauen Blüten gewonnene Anthocyan zeigte dagegen — wieder in Übereinstimmung mit Smith — gute Farbtonumschläge. Die pH-abhängigen Farbabstufungen nahmen etwa eine Mittelstellung ein zwischen den beiden von Smith auf Tafel VI gegebenen Farbreihen für *Cineraria* royal blue und *Cineraria* ‚Woncler Queen'. Die elektrometrische Preßsaftmessung ergab aber für beide Spielarten übereinstimmend einen pH-Wert von 5,4. Die von Smith angeführten unterschiedlichen pH-Werte sowie die Schlußfolgerungen von Cholnoky lassen sich also kaum aufrechterhalten.

Andererseits wissen wir aber auch nicht, ob der pH-Wert des Preßsaftes mit dem pH-Wert des Zellsaftes der lebenden Zelle gleichzusetzen ist, wenn sich auch einige sehr nahe liegende Einwände entkräften lassen. So muß man unbedingt darauf hinweisen, daß das Anthocyan vorwiegend nur in den Epidermiszellen lokalisiert ist, der Preßsaft schließt aber auch die Zellen des Mesophylls mit ein, die vielleicht seine saure Reaktion bedingen. Diesem Einwand kann aber entgegengehalten werden, daß das Anthocyan der blauen oder blauvioletten Blüten im Preßsaft kaum eine Farbtonänderung zeigte, die auf eine stärkere Ansäuerung hätte hinweisen können.

Sehr wahrscheinlich liegen bei den blauen *Cineraria*-Blüten ähnliche Verhältnisse vor wie bei der Kornblume, d. h. daß hier den Zellsaftkolloiden neben anderen Faktoren für den Farbton des Anthocyans eine gewisse Bedeutung zukommt. Ich erinnere in diesem Zusammenhang auch an die „vollen Zellsäfte" im Sinne Höflers (1947) und ihren Einfluß auf den Farbton der von der Vakuole gespeicherten synthetischen Vitalfarbstoffe (Wiesner 1931). Gerade die Epidermen zeichnen sich ja häufig durch den Besitz voller Zellsäfte aus.

Es sei nochmals ausdrücklich betont, daß wir den gefundenen pH-Wert des Preßsaftes nicht ohne weiteres dem pH-Wert des Zellsaftes gleichsetzen dürfen, aber ebensowenig können wir aus dem Farbton des zelleigenen Anthocyans, besonders der blauen Blüten, zuverlässige Rückschlüsse auf die cH des Zellsaftes ziehen.

Literatur

Atkins, W. R. G., 1922: The hydrogen ion concentration of plant cells. Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. (N. S.) *16*, 414.

— 1923: The hydrogen ion concentration of the soil in relation to the flower colour of *Hydrangea hortensis* W. Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. (N. S.) *17*, 23.

Bethe, A., 1932: Allgemeine Physiologie. Berlin-Göttingen-Heidelberg.

Buxton, B. H., and F. V. Darbishire, 1929: Behavior of „anthocyanins" at varying hydrogen ion concentrations. J. Genetics *21*, 71.

Cholnoky, B. J., 1930: Beobachtungen über die Farbstoffaufnahme anthozyanführender Zellen. Mikroskopie *5*, 117.

Höfler, K., 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung. Mikroskopie *2*, 13.

Kraus, G., 1884: Über die Wasserverteilung in der Pflanze IV. Die Acidität des Zellsaftes. Sonderdr. aus Abh. naturforsch. Ges. Halle *16*.

Küster, E., 1951: Die Pflanzenzelle. 2. Aufl. Jena.

Robinson, R., 1933: Natural colouring matters and their analogues. Nature *132*, 625.

Robinson, G. M., 1939: Notes on variable colours of flower petals. J. amer. chem. soc. *61*, 1606.

Rohde, K., 1917: Untersuchungen über den Einfluß der freien H-Ionen im Innern lebender Zellen auf den Vorgang der vitalen Färbung. Pflügers Arch. *168*, 411.

Smith, E. P., 1933: The calibration of flower colour indicators. Protoplasma *18*, 112.

Wiesner, G., 1951: Untersuchungen über Vitalfärbung von *Allium*-Zellen mit basischen Hellfeldfarbstoffen. Protoplasma *40*, 405.

Willstätter, R., 1914: Farbstoffe der Kornblume. Liebigs Annalen *401*, 189.

— 1914: Über Pflanzenfarbstoffe. Ber. dtsch. chem. Ges. *47*, 2831.

Virus-Kristalle in *Lilium*

Von

Friedl Weber

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 1 Textabbildung

(Eingelangt am 12. September 1954)

Die aus Virus enthaltenden, gereinigten Pflanzensäften *in vitro* sich ausscheidenden kristallinen Gebilde sind „fibrous and not true crystals" (Bawden 1950 : 43). Auch die in der lebenden Virus-infizierten Pflanzenzelle auftretenden Einschlußkörper sind sehr häufig „Eiweißfibrillenbündel"; so lassen insbesondere die Eiweißspindeln der Kakteen (Weber und Kenda 1952) nicht selten eine fibrilläre Struktur erkennen. Echte

Virus-Eiweißkristalle sind in der lebenden Zelle viel seltener beobachtet worden. Die Eiweißkristalle im Cytoplasma von *Lilium Henryi*, die Weber (1954) als „Viruskristalle" auffaßt, verdienen daher besondere Beachtung. Am häufigsten finden sie sich in der Epidermis der reifenden Fruchtwand, jedoch ist ihr Vorkommen nicht auf die Frucht beschränkt. Sie treten auch in der Epidermis des Stengels auf sowie, wenn auch seltener, in der Oberhaut der Laubblätter.[1] Die Form und Größe der Kristalle ist recht verschieden, es stehen derzeit nicht genügend Pflanzen zur Verfügung, um eine genauere kristallographische Untersuchung durchführen zu können. Es herrschen Formen vor, die wahrscheinlich dem rhombischen

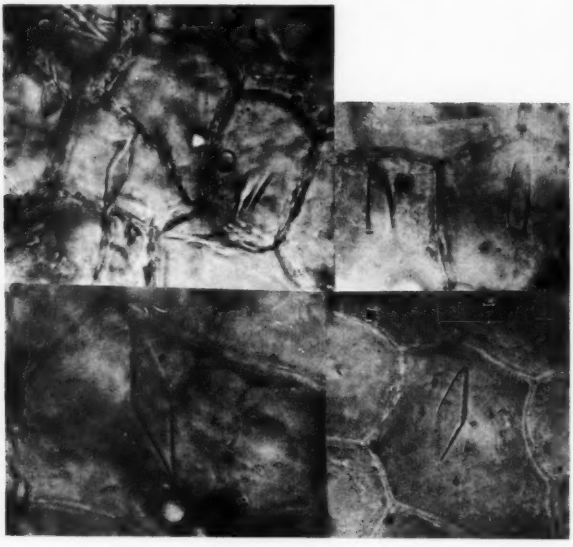


Abb. 1. Eiweiß-(Virus-)Kristalle aus der Epidermis der Fruchtknotenwand von *Lilium Henryi*.

System angehören, kurze Prismen und flache Plättchen können vorkommen (Abb. 1). Molisch (1923) hat nach Zimmermann Proteinkristalle dieser Gestalt aus den Zellkernen von *Melampyrum* und von *Russelia* abgebildet. Wenn in einer Fruchtwandzelle von *Lilium Henryi* nur ein Kristall auftritt, so kann er beträchtliche Größe erreichen; häufig enthält aber eine Zelle mehrere Kristalle, die kleiner sind und von der Cytoplasmaströmung rascher in der Zelle umhergeführt werden. Durch die stetige Lageveränderung der Kristalle wird die photographische Aufnahme erschwert. In der Epidermis der oberen Laubblätter sind die kristallinen Einschlußkörper vielfach anders gestaltet, sie sind dort häufig schmale,

[1] Auch in der Epidermis der Zwiebelschuppen sind sie zu finden, nicht aber in den Stomazellen.

ziemlich lange Spindeln. Unter der Einwirkung von Jodjodkali oder des Millonschen Reagens kontrahieren sich die Spindeln korkzieherartig und nehmen „Trypanoplasten"-Gestalt an, ähnlich wie die Virus-Eiweißspindeln von *Rhipsalis* (Weber 1951).

Auch bei *Lilium sutchuenense* aus dem Botanischen Garten der Universität Graz wurden in der Fruchtwand-Oberhaut Eiweißkristalle gesehen; sie waren kleiner und ihre Kristallform war weniger gut ausgebildet als bei *Lilium Henryi*.

Literatur

Bawden, 1950: Plant Viruses and Virus Diseases. Waltham, Mass., USA.
Molisch, 1923: Mikrochemie der Pflanze. III. Aufl. Jena.
Weber, 1952: Trypanoplasten-Viruskörper von *Rhipsalis*. Phyton 3.
— 1954: Eiweißkristalle in *Lilium Henryi*. Phyton 5.
Weber und Kenda, 1952: Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln. Protoplasma *41*.

Referate

Small, James: Modern Aspects of pH. With Special Reference to Plants and Soils. Mit 30 Fig. XI, 247 S. London: Baillière, Tindall and Cox, 1954. 20s. net.

In dem Vorwort zu diesem Buch, nach dem viele Hände greifen werden, schreibt Small, der bereits 1929 eine monographische Darstellung über den großen Tatsachen- und Fragenkomplex Hydrogen Ion Concentration in Plant Cells and Tissues gegeben und die Wandlung des pH-Begriffes seither dauernd mit Interesse und Kritik verfolgt hat: The new pH is based upon an empirical standard as a result of the official recognition that what is being measured is not the concentration but the activity of hydrogen ions in relation to the activity of other associated ions. Die Reichhaltigkeit dieses neuen Buches ergibt sich auf den ersten Blick aus dem wohlgegliederten Verzeichnis seines Inhalts: History of the pH Scale. Estimation of pH Values. Buffer Systems. Buffer Index Values. pH and Cell-Sap. Carbon Dioxide Effects. Base Avidities of Surfaces and Non-Aqueous Media. Environmental pH Relations. Buffer Capacity of Soil. Soil pH Values in Ecology. Water pH Values in Ecology and Soil-pH in Agriculture. Plant Hormones and pH. Enzymes and pH. pH and Succulents. pH in Industry. Im Anhang folgen pH Data for Some Micro-Organisms. Dissociation and Acids. Ein reiches Literaturverzeichnis beschließt das Buch, das für den Zellphysiologen gleich wertvoll ist wie für den Ökologen.

F. Weber (Graz).

Sex in Microorganisms. A symposium. 4 u. 362 S. Washington 1954.

Ein Symposium, auf dem von berufenen Forschern über eine Reihe im Mittelpunkt des Interesses der Forschung über die Sexualität der Mikroorganismen stehender Probleme berichtet wurde. Folgende Themen wurden erörtert: Visconti: Genetic Recombination in Bacterial Viruses. Lederberg and Tatum: Sex in Bacteria: Genetic Studies, 1952—1954. Hutchinson and Stempen: Sex in Bacteria: Evidence from Morphology. Raper: Life Cycles, Sexuality and Sexual Mechanisms in the Fungi. Patrick: Sexual Reproduction in Diatoms. Lewin: Sex in Unicellular Algae. Wenrich: Sex in Protozoa. Nanney: Mating Type Determination in *Paramecium aurelia*. Metz: Mating Substances and the Physiology of Fertilization in Ciliates. Wenrich: Comments on the Origin and Evolution of „Sex". Indem so das sexuelle Verhalten der wichtigsten Typen der Mikroorganismen dargestellt wird, ergibt sich ein ausgezeichneter Überblick über die trotz aller Mannigfaltigkeit sich darbietenden gemeinsamen Züge.

F. Weber (Graz).

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag, Wien I, Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. Friedl Weber, Graz, Schubertstr. 51, und Prof. Dr. Josef Spek, Rostock, Zoologisches Institut. — Druck: Adolf Holzhausens Nfg., Wien VII, Kandlgasse 19-21

Fortsetzung von der II. Umschlagseite

Kurze Mitteilungen

Rieth, A., und **H. A. v. Stosch:** Der Kapillarheber, ein Bauelement zur Herstellung von Durchströmungspräparaten 363
Stosch, H. A. v.: Eine Kammer für mikroskopische Lebenduntersuchungen mit Trennung von Objekt und strömendem Medium 365
Sponsler, O. L., and **J. D. Bath:** Numerical Aspects of Protein Molecules in *Escherichia coli* 369
Drawert, E.: Über die Eignung zelleigener Anthocyane zur pH-Wert-Bestimmung des Zellsaftes 370
Weber, F.: Virus-Kristalle in *Lilium* 373

Referate 376

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Nagai, S.: The Reduction of Silver Nitrate by Plant Cells, Particularly by Chloroplasts 24. 6. 1954
Ziegenspeck, H.: Das Vorkommen von Fila in radialer Anordnung in den Schließzellen 16. 8. 1954
Weber, F.: „Elaioplasten" fehlen den Schließzellen von *Hosta plantaginea* 15. 9. 1954
Weber, F.: „Sterinoplasten" fehlen den Schließzellen 18. 9. 1954
Mayr, H. H.: Zur Kenntnis des osmotischen Verhaltens von Getreidewurzeln 30. 9. 1954
de Rezende-Pinto, M., und **A. de Lemos Pereira:** Über die Struktur der Chloroplasten von *Oedogonium* 7. 10. 1954
Hellbrunn, L. V., and **W. L. Wilson:** The Initiation of Cell Division in the *Chaetopterus* Egg 28. 10. 1954
Flasch, Assunta: Die Wirkung von Coffein auf vitalgefärbte Pflanzenzellen 25. 10. 1954
Markert, Susanne: Untersuchungen über den Einfluß von Elektrolyten auf die Viskosität von pflanzlichen Solen. 28. 9. 1954
Schaefer, G.: Ein Versuch zur quantitativen Auswertung der Plasmolyseform- und -zeitmethode 22. 11. 1954
Thaler, Irmtraud: Die Leukoplasten von *Helleborus* 26. 11. 1954
Weber, F.: Kalziumoxalat-Kristalle fehlen den Schließzellen 26. 11. 1954
Kaunat, H.: Die Wirkung von Antibiotika auf *Paramaecium caudatum* . . 20. 12. 1954
Currier, H. B., and **W. van der Zweep:** Plasmolysis and the Tetrazolium Reaction in *Anacharis canadensis* 8. 1. 1955
Böing, J.: Vitaluntersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Chloroplasten von *Helodea densa* 8. 1. 1955
Kinzel, H.: Zur Kausalfrage der Zellwand-Fluorochromierung mit Akridinorange 17. 1. 1955
Kiermayer, O.: Ringförmige Zellinhaltskörper bei *Spirogyra maxima* . . . 20. 1. 1955
Frey-Wyssling, A., F. Ruch und **X. Berger:** Monotrope Plastiden-Metamorphose 31. 1. 1955
Baumeister, W.: Über den Einfluß des Zinks auf das Pflanzenwachstum . 8. 2. 1955

SPRINGER-VERLAG IN WIEN I

Soeben erscheint:

Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas

Von

Prof. Dr. **A. Frey-Wyssling**

Institut für Allgemeine Botanik der Eidg. Technischen Hochschule Zürich

Mit 90 Textabbildungen. Etwa 260 Seiten. Gr.-8°. 1955

(Erscheint im Rahmen von „Protoplasmatologia". Handbuch der Protoplasmaforschung. Herausgegeben von Prof. Dr. L. V. Heilbrunn, Philadelphia, und Prof. Dr. F. Weber, Graz. Band II: Cytoplasma. A. Morphologie/2.)

Über die Disposition und Erscheinungsweise des Handbuches erteilt der Verlag bereitwilligst Auskunft

Vorbestellpreis gültig bis Ende Februar 1955

S 204.—, DM 34.—, $ 8.10, sfr. 34.80

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen S 255.—, DM 42.50, $ 10.10, sfr. 43.50

Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches gilt der Vorbestellpreis weiter als Subskriptionspreis

Der Inhalt dieses Bandes ist in die Abschnitte Elektronenmikroskopische Cytomorphologie, Cytochemie, Cytophysik und Cytophysiologie gegliedert. Die Ergebnisse der Strukturlehre werden im Zusammenhang mit den Fragen der Plasmaströmung, der Muskelkontraktion, der Nerventätigkeit, der Stoffaufnahme usw. besprochen, wodurch eine kritische Wertung verschiedener Anschauungen ermöglicht wird. Das Buch ist ein Vademekum für alle Cytologen, Naturwissenschaftler und Mediziner, die sich für den Feinbau der Lebenssubstanz interessieren. Es bildet eine willkommene Ergänzung zu dem bekannten Buche „Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate", das 1938 in deutscher Sprache und seither in zwei englischen Auflagen erschienen ist.

Österreichische Botanische Zeitschrift

Herausgegeben von

L. Geitler, Wien

Zuletzt erschien:

Band 101, 5. (Schluß-) Heft. (Ausgegeben im November 1954.) Mit 61 Textabbildungen. 162 Seiten. 1954. S 210.—, DM 35.—, $ 8.35, sfr. 35.90

Inhaltsverzeichnis: Abhandlungen. **L. Geitler,** Paarbildung und Gametenfusion bei *Anomoeoneis exilis* und einigen anderen pennaten Diatomeen. — **Ilse Zeitler,** Untersuchungen über die Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik von Flechtengonidien. — **R. Beschel,** Der Formenkreis von *Parmelia andreana* und seine Unterscheidung von *Parmelia dubia* und *Parmelia caperata*. — **F. Weber,** Ist die Panaschierung des „Zimmeröonium" eine Virose? — **R. Biebl,** Lichtgenuß und Strahlenempfindlichkeit einiger Schattenmoose. — **H. D. Wulff,** Über das spontane Auftreten einer Caninae-Meiosis bei der Mikrosporogenese der diploiden *Rosa ruga* LINDL. — **W. Leinfellner,** Beiträge zur Kronblattmorphologie. II. Die Formenmannigfaltigkeit der peltaten und diplophyllen Kronblätter von *Waldsteinia geoides*. — **Irmtraud Thaler,** Eiweißspindeln von *Valerianella*. — **L. Geitler,** Oogamie bei *Chlamydomonas*. — **K. Keck** und **E. Kaiser,** Die C-mitotische Wirksamkeit von Demecolcin im *Allium cepa*-Test. — **W. Leinfellner,** Beiträge zur Kronblattmorphologie. III. Die Kronblätter der Gattung *Pachyphytum*. — **K. Stopp,** Über die Wuchsform amphikarper *Phaseolus*- und *Amphicarpaea*-Arten. — Kurze Mitteilung. **F. Buxbaum,** *Leptocladodia* F. BUXB. nomen novum. — Besprechungen.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung